

81758
1921

TRYPANOSOMEN EN LAGE TEMPERATUREN.

K. ZANDBERGEN.

TRYPANOSOMEN EN
LAGE TEMPERATUREN.

Leiden Medical Library

TRYPANOSOMEN EN LAGE TEMPERATUREN.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE LEIDEN,

OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS

Dr. C. SNOUCK HURGRONJE,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN
WIJSBEGEERTE,

VOOR DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN

OP

VRIJDAG 7 APRIL 1922, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR,

DOOR

K. ZANDBERGEN, Arts,
GEBOREN TE RIJNSBURG.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154023_0028

Aan mijne Moeder.

Het voltooien van dit proefschrift, het einde mijner academischen studie, biedt mij de welkome gelegenheid U, Hooggeleerden, Lectoren en Privaat-docenten der Geneeskundige en Philosophische Faculteiten, openlijk te mogen bedanken voor het van U genoten onderwijs.

Voor al U, Hooggeleerde de Jong, hooggeachte Promotor, ben ik veel dank verschuldigd voor de groote bereidwilligheid, waarmede gij als promotor hebt willen optreden. Het werken op Uw laboratorium, onder Uwe leiding, zal mij ook later van grooten dienst zijn.

U, Hooggeleerde Kamerlingh Onnes, breng ik mijn dank voor de groote bereidwilligheid, waarmede gij Uw laboratorium voor mij opensteldet.

Hartelijken dank ook aan U, Zeergeleerde Crommelin, voor Uwe hulp en belangstelling, die ik van U mocht ondervinden bij het werken met de zeer lage temperaturen.

U, Hooggeleerde Blanksma, dank ik voor het in bruikleen afstaan van de Cryogène de Cailletet.

Steeds zal mij de prettige samenwerking in herinnering blijven met U, Zeergeleerde Bakker, die mij in veel terzijde stond en geheel met mijn werk meeleeftde.

Aan U, Veltema en het verdere personeel van het Laboratorium voor Vergelijkende Pathologie, mijn dank voor de technische hulp.

Ten slotte mijn dank aan de Heeren Flin en Ouwerkerk, die mij, op het Physisch Laboratorium, zeer bereidwillig het materiaal voor zeer lage temperaturen verschaften.

INHOUD.

	Bladz.
INLEIDING	1
HOOFDSTUK I. LITERATUUR-OVERZICHT .	4
1. HET OVERLEVEN VAN DE TRYPANOSOMEN IN HET CADAVER	4
2. HET OVERLEVEN VAN DE TRYPANOSOMEN BUITEN HET LICHAAM	6
HOOFDSTUK II. EIGEN ONDERZOEK . .	19
1. DE GEBRUIKTE TRYPANOSOMEN-SOORTEN . .	19
2. DE TOEGEPASTE TEMPERATUREN	23
3. GEVOLGDE TECHNIEK	28
4. VERLOOP DER PROEVEN IN 'T ALGEMEEN . .	32
5. TRYPANOSOMA LEWISI	37
6. „ EVANSI	41
7. „ EQUIPERDUM	50
8. „ VENEZUELENSE	60
9. „ BRUCEI	67
HOOFDSTUK III. ALGEMEEN OVERZICHT DER VERKREGEN RESULTATEN EN GEVOLGTREKKINGEN	81
STELLINGEN	93

INLEIDING.

Men verstaat onder *Trypanosomen* ééncellige, dierlijke bloedparasieten uit de orde der Protomonadina, onderklasse Zoömastigina, klasse Mastigophora, ondergroep Plasmodroma van de hoofd-groep Protozoa ¹⁾.

Ze hebben een min of meer gerekt spoelvormig lichaam, zijdelings van een *unduleerende membraan* voorzien, waarvan de verdikte rand, als *zweepdraad* of *flagellum* bekend, uit een in de achterste lichaamshelft zich bevindenden *blepharoplast* blijkt te ontspringen en naar voren een vrij gedeelte heeft, dat soms zeer lang kan zijn.

Behalve de blepharoplast, ook wel als *bijkern* of als *centrosoom* aangeduid, bezit het lichaam een grootere, *echte kern*, ongeveer in het midden gelegen, en in tegenstelling met de bijkern, ook als *hoofdkern* aangeduid.

In het ongekleurde praeparaat zijn deze twee kernen als lichtbrekende lichaampjes te zien.

Voor de bewegingen komen twee samenwerkende oorzaken in aanmerking; klaarblijkelijk is het lichaam zelf contractiel, waardoor samentrekkingen en lichte spiraalbewegingen kunnen ontstaan; daarbij voegt zich een voortgaande beweging door middel van de unduleerende membraan en de zweepdraad.

Door deze bewegingen zelf en door de schoksgewijze, ietwat ronddraaiende beweging, die de Trypanosomen aan de bloedlichaampjes geven, is hun aanwezigheid in een druppel bloed, al of niet met een conserveeringsmiddel, in een vochtig praeparaat onder het dekglas of in een vochtige kamer, onder het microscoop, gemakkelijk te herkennen.

¹⁾ Indeling naar F. Doflein, Lehrbuch der Protozoenkunde, vierte Auflage, Jena, Gustav Fischer, 1916.

Voor verdere morphologische studie dient men gekleurde praeparaten te onderzoeken, waarvoor de kleurmethode volgens Romanowsky, respectievelijk Giemsa, Leishman, Kiewiet de Jonge, Manson, Heidenhain, Twort en anderen zeer geschikte zijn.

Tot 1901 was de algemeen heerschende opvatting, dat Trypanosomen aan *menschelijke ziekten* vreemd waren, maar in dat jaar vond de Engelschman Dutton ¹⁾ in het bloed van een Europeaan een Trypanosoom, en Castellani ²⁾ vond in 1903 een Trypanosoom in het cerebro-spinaalvocht van negers, die aan slaapziekte leden, welke ontdekking zeer spoedig door soortgelijke gevolgd werd.

Sindsdien gaven de *pathogene* Trypanosomen aanleiding tot ontelbare laboratorium-onderzoekingen, die zeer belangrijke resultaten opleverden wat betreft hun morphologie, pathogeen vermogen, manier van voortplanten, chemotherapie, enz.

Over den invloed van *koude* of *lage temperaturen* op Trypanosomen is, ondanks de zeer uitgebreide Trypanosomen-literatuur, in de verschillende handboeken en tijdschriften slechts zeer weinig te vinden.

In verband met deze, vaak nog tegenstrijdige gegevens over dit onderwerp, waarvan men een overzicht vindt in het bekende handboek over Trypanosomen van Laveran en Mesnil ³⁾, scheen het gewenscht, daar het Laboratorium voor Vergelijkende Pathologie over verschillende Trypanosomen-soorten de beschikking had, nader den invloed van *bepaalde*, zooveel mogelijk *constante lage temperaturen*, daarop

¹⁾ Dutton, British medical Journal, 1902, II, 20 Sept. p. 881.

Dutton, The journal of tropical Medicine, Vol. 5, 1 Dec. 1902, p. 362.

²⁾ Castellani, Journal of tropical Medicine, Vol. 6, 1 Juni 1903, p. 167.

Castellani, Proceedings of the Royal Society, t. CLXXI, 1903, p. 501.

Castellani, Reports of the Sleeping Sickness Commission, Royal Society, No. 1, Aug. 1903.

³⁾ A. Laveran et F. Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis, Paris, Masson et Cie., 1912.

na te gaan. Vooral ook, nu Prof. Kamerlingh Onnes zeer bereidwillig de gewenschte hoeveelheden vloeibare lucht ter beschikking stelde.

Misschien zou, zodoende, dit onderzoek ook kunnen leiden tot het vinden van een kenmerk der verschillende soorten, die tot nog toe niet in alle gevallen duidelijk zijn te scheiden.

Van de verkregen resultaten wordt hierachter verslag gegeven. Echter was het gewenscht vooraf ook in de literatuur na te gaan, wat gezegd wordt met de Trypanosomen te geschieden, indien de gastheer sterft, en dus de temperatuur in het cadaver meer of minder snel gaat dalen, totdat die van de omgeving is bereikt.

Verder is bekend, dat men Trypanosomen in bloed, al of niet gemengd met andere stoffen, *in vitro* eenigen tijd levend kan houden, waarbij de hoedanigheid van het *bloedmedium*, de meer of mindere *steriliteit*, waaronder men werkt en de *temperatuur*, waarbij het materiaal wordt bewaard, van invloed zijn.

Ook hiervan wordt in het volgende overzicht het voor- naamste, wat de literatuur daaromtrent vermeldt, aangegeven.

HOOFDSTUK I.

LITERATUUR-OVERZICHT.

I. Het overleven van de Trypanosomen in het cadaver.

De Trypanosomen blijven nooit langen tijd levend, wanneer de gastheer is gesucombeerd.

Kort vóór den dood van hun hospes worden zelfs de niet reeds gestorven exemplaren minder beweeglijk en vertoonen veranderingen van het protoplasma; dat een groot deel reeds gestorven is, blijkt uit het vinden van talrijke vervalsvormen in het bloed.

Voordat de Trypanosomen zelf sterven, ondergaan ze verschillende veranderingen, als het optreden van holten en korrels in het protoplasma, terwijl de slanke, goed beweeglijke, levende vorm overgaat in een meer rond-langwerpigen met verminderde beweeglijkheid. De omvang der parasieten schijnt bovendien wat vergroot.

Alleen op de beweeglijkheid afgaande, is het niet te beslissen of een Trypanosoom dood of nog levend is. Want een beweeglijk Trypanosoom kan het vermogen missen om zich te vermenigvuldigen en dikwijls wordt een inoculatie van beweeglijke Trypanosomen niet door een infectie gevolgd. Evenzoo zijn onbeweeglijke Trypanosomen niet altijd dood, want inoculatie, bij een gevoelig dier, kan soms door een infectie worden gevolgd.

De duur van het overleven blijkt af te hangen van het bederf van het lichaam van den gastheer, dus moet ook de buitentemperatuur daarbij een rol spelen. Want bij het

bestudeeren van Trypanosomen, die bij ratten gevonden worden (*Tryp. Lewisi*), merkten de Fransche onderzoekers, Laveran en Mesnil ¹⁾ op, dat in het laboratorium de Trypanosomen, na den dood der dieren, 's winters langer in leven bleven, dan in den zomer.

De vitaliteit van de verschillende Trypanosomen-soorten varieert daarbij iets. Het langst houden de niet-pathogene, zooals het *Tryp. Lewisi*, het in de cadavers uit. Zoo vertoonende doode ratten, 5—6 dagen in een koude kamer bewaard, nog levende Trypanosomen in de lever en de *vena portae* ²⁾.

Ongeveer 24 uur na den dood, vooral bij de kleine dieren, zijn de *pathogene* Trypanosomen in het bloed of in de organen niet meer beweeglijk, of wel slechts in uiterst gering aantal; het bloed is soms nog virulent.

Onderzoekingen op witte muizen, die met *Nagana*-, *Surra*-, *Dourine*-, *Mal de Caderas*- en *El Debab*-verwekkers geïnfecteerd waren, werden door Yakimoff en Nina Kohl verricht, die vonden, dat de bij 2,5°—5° C. bewaarde cadavers, levende Trypanosomen bevatten gedurende 30 uur; doch geen levende exemplaren werden meer gevonden, wanneer dezelfde cadavers op kamertemperatuur (19°—20° C.) werden bewaard ³⁾.

Kanthack, Durham en Blandford zagen, dat materiaal van dieren, die aan *Nagana* gestorven waren, na 24 uur (soms veel korter) bijna nooit meer infectieus was, zelfs niet, wanneer eenige cM³ bij proefdieren werden ingespoten, daar zeer snel veranderingen in de lichamen van aan *Nagana* gestorven dieren optreden ⁴⁾.

¹⁾ Laveran et Mesnil. Trypanosomes et Trypanosomiasis, 1912, p. 81.

²⁾ C. Biot, R. Biot et Richard, Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie. t. LXXI, 1911, p. 368.

³⁾ Yakimoff, Comptes Rendus de la Société de Biologie, t. LXI, 1906, p. 631.

⁴⁾ Kanthack, Durham and Blandford, Proceedings of the Royal Society, Vol. LXIV, p. 100, en Hygienische Rundschau, Vol. VIII, S. 1185.

II. Het overleven van de Trypanosomen buiten het lichaam.

Eén van de voorwaarden voor het levend blijven der Trypanosomen buiten het lichaam, afgezien van de cultuur, is het hebben van *aseptisch* ¹⁾ opgevangen, met Trypanosomen geïnfecteerd, bloed (uit de arteria carotis of nog beter uit het hart bij kleine dieren, uit de vena jugularis bij groote dieren).

Want, hoewel een geringe bacterie-groei in het begin nauwelijks invloed uitoefent op het leven der parasieten, gaan ze, zoodra het tot sterkere vermenigvuldiging, vooral tot rotting, komt, spoedig ten gronde.

Hierin ligt opgesloten, dat in deze omstandigheden ook de *temperatuur*, waarbij het bloed bewaard wordt, invloed moet uitoefenen, omdat, nog afgezien van den invloed van de temperatuur op de Trypanosomen zelf, de groei van, bij het opvangen van het bloed mede opgevangen, micro-organismen van de temperatuur afhankelijk is ¹⁾.

Ook de *stolling* van het bloed dient men tegen te gaan; daarvoor wordt het in steriele buizen met behulp van glasparsels gedefribineerd of, nog beter, gemengd met een citras-natricus oplossing (H_2O 1000 gr., NaCl 5 gr., Nacitraat 5 gr.).

De duur van het levend blijven was zeer wisselend, maar spoedig bleek toch, dat het Tryp. Lewisi buitengewoon weerstandbiedend en levenskrachtig was en dat de *temperatuur*, waarbij het werd gehouden, een grooten invloed had.

De eerste mededeeling dienaangaande is van Danilewsky ²⁾, die het Tryp. Lewisi, in rattenbloed in pipetten, bij gewone kamertemperatuur bewaard, gedurende 8—9 dagen levend hield. Jonge Trypanosomen vertoonen nog na 10—12 dagen hun onveranderde beweeglijkheid.

¹⁾ Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis, 1912, p. 24.

²⁾ Danilewsky, La parasitologie comparée du sang, Kharkoff, 1889. I. p. 74.

Rabinowitsch en Kempner ¹⁾ vonden, dat bloed van een geïnfecteerde rat, bij kamer- en broedstoof-temperatuur bewaard, nog na 1 week infectieus was.

Laveran en Mesnil ²⁾, die reeds opgemerkt hadden, dat het Tryp. Lewisi in rattencadavers 's winters veel langer in leven bleef dan in den zomer, zagen, dat deze parasiet in vitro ook veel langer in leven bleef in bloed, dat in de ijskast bewaard werd, dan in dat, bewaard op gewone kamer-temperatuur. In gedefribineerd bloed (zuiver of tot de helft met physiologische zoutoplossing verdund) bleven de Trypanosomen in het laboratorium (temp.: 19°—20° C.) 4—5 dagen, in de ijskast (temp.: 5°—8° C.) gedurende 1—1½ maand levenskrachtig en infectieus, wat uit de volgende proeven blijkt:

Na 23 dagen in de ijskast bewaard te zijn geweest, gaven entingen positieve resultaten;

Na 47 dagen bewaren, werden 2 entingen gedaan, waarvan 1 met positieven uitslag;

Na 51 dagen waren geen parasieten meer aan te toonen, maar toch gaf een enting nog een positief resultaat.

In het bloed, met physiologische Na Cl-oplossing gemengd en in de ijskast bewaard, behouden de Trypanosomen lang hun normaal aspect; ze zijn in het begin zeer beweeglijk en bewegen zich afzonderlijk te midden der bloedlichaampjes. In de eerste 24 uur komt het zelfs tot vermeerdering der Trypanosomen, alhoewel dit geen bewijs voor verhoogde levenstaaiheid is. Zooals verschillende Protozoën, willen ook de Trypanosomen, zoodra ze onder ongunstige voedings-verhoudingen dreigen te komen, zich gaan deelen. Men vindt in dergelijke gevallen zelfs vaak *meervoudige, onvolledige* deelingen. Dit zijn voortgezette tweedeelingen, waarbij, door bepaalde functie-stoornissen, de *volledige* deeling van het protoplasma-lichaam niet meer volgen kan.

¹⁾ Rabinowitsch und Kempner, Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, Bd. 30, 1899, S. 251.

²⁾ Laveran et Mesnil, Comptes rendus de la Société de Biologie, 1900, p. 816.

En na 3 dagen ziet men agglomeratie der Trypanosomen; na meer dan 5 dagen zijn de meeste Trypanosomen gegranuleerd en naarmate de tijd, gedurende welke ze in de ijskast verblijven, langer wordt, vermindert langzamerhand het aantal levende exemplaren. Bovendien vertoonen de parasieten, die nog levend zijn, niet meer hun oorspronkelijke levendigheid en de vermindering der beweging is zeer duidelijk in bloed, dat gedurende 20—30 dagen in de ijskast is bewaard geworden.

Maakt men hierna praeparaten van bloed, dat op deze manier bewaard is, dan ziet men bij verwarming, de beweging der parasieten, die eerst zeer langzaam waren, sneller worden.

Een afwijkend resultaat verkreeg Jürgens¹⁾, toen hij het Tryp. Lewisi, in capillair-buisjes of in den hangenden druppel, bij een temperatuur van 5° —8° C. bewaarde.

De tijd, waarna dit Trypanosoom nog levensvatbaar en infectieus bleek te zijn, was 32. respektievelijk 53 dagen.

Uit het medegedeelde blijkt dus wel, dat de niet-pathogene Trypanosomen, tenminste, indien men het Tryp. Lewisi, de eenige goed bestudeerde soort op dit punt, daartoe rekent, wat niet volkomen juist is, langen tijd in leven kunnen blijven.

Glucose zou, volgens Biot en Richard²⁾ een rol spelen bij het bewaren in vitro van het Tryp. Lewisi.

Ze hadden opgemerkt, dat bij doode ratten, dragers van Tryp. Lewisi, waarvan de sectie eenige dagen was uitgesteld, de lever de Trypanosomen het langst in levenden toestand scheen te bevatten.

Bij cadavers, 5 of 6 dagen in een koude kamer bewaard, was het voldoende, wanneer het hartebloed geen Trypanosomen meer bevatte, een stukje lever in een isotonische

¹⁾ Jürgens, Archiv für Hygiene, Bd. 42, 1902, S. 265.

Zie ook: Simons, Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankheiten 87, 1918, S. 1.

²⁾ C. Biot, R. Biot et Richard, Comptes Rendus de la Société de Biologie, t. LXXI, 1911, p. 368.

Na Cl-solutie fijn te maken, om in het aldus verkregen vocht, de parasieten te kunnen aantonen. Zoo bevatte ook het poortaderstelsel nog parasieten.

Dit deed hen denken aan een eventueelen invloed van glucose op de Trypanosomen.

Om nu na te gaan of glucose werkelijk invloed uitoefende op het leven der Trypanosomen in vitro, vulden Biot en Richard kleine glazen buisjes met bloed, vol Tryp. Lewisi, verdund met citraatserum en maakten die dicht met was of paraffine. Aan een serie buisjes voegden ze glucose toe, aan een andere serie, die voor contraproef werden gebruikt, niet.

Na 4—5 dagen bij kamertemperatuur te zijn gehouden, waren de Trypanosomen uit de buisjes zonder glucose *verdwenen*, doch in die, waaraan glucose was toegevoegd, bleven de parasieten 10—12 dagen levend, een keer zelfs 15 dagen.

Hieruit concludeerden zij, dat glucose in het leven der Trypanosomen een rol speelde; hetzij direct, door als voedsel te dienen, hetzij indirect, door vertraging van de werking van eventueel het bestaan der parasieten bedreigende *trypanolytische* stoffen.

Ook Fleig ¹⁾ ging de werking van glucose na en zag, dat het Tryp. Lewisi, bij 17° C. bewaard in citraatbloed in een dichte flesch 10—15 dagen (in plaats van 4—5 dagen) levend bleef, wanneer hij glucose aan het bloed toevoegde.

Uit de hierachter beschreven eigen proeven blijkt eveneens, dat het Tryp. Lewisi, in de ijskast bewaard, een groot aantal dagen in leven blijft.

Het grootste aantal dagen, waarna ik nog beweeglijke Trypanosomen heb kunnen vinden, was 50; de rat, met $\frac{7}{10}$ c.c. van dit bloed intraperitoneaal geënt, vertoonde echter nooit Trypanosomen in het bloed.

Zeër duidelijk bleek ook de levensverlengende invloed van glucose op deze Trypanosomen.

¹⁾ Fleig, Comptes Rendus de la Société de Biologie, t. LXXI, 25 Nov. 1911, p. 527.

In verband met deze werking van glucose moeten hier ook enkele resultaten vermeld worden van een groot aantal onderzoekingen, die, vanwege het groote belang, dat een afdoende bestrijding der Trypanosomiasen heeft, uit een therapeutisch oogpunt omtrent de werking van verschillende stoffen op het leven der Trypanosomen in vitro zijn gedaan.

Daar de Trypanosomen *plasma-parasieten* zijn, lag het voor de hand, dat verschillende onderzoekers nagingen, welken invloed *sera* van *normale dieren* uitoefenden.

Daarbij bleek dat in 't algemeen *sera* van zoogdieren en vogels den levensduur der Zoogdier-Trypanosomen verlengen ¹⁾, ²⁾, terwijl de *sera* van *koudbloedige vertebraten* die Trypanosomen vernietigen ³⁾, ⁴⁾.

Een levensverlengende werking oefenen ook de *extracten* van *sommige organen*, o.a. die van de lever, uit ⁵⁾, ⁶⁾, terwijl van de chemische stoffen het *HCl* de vitaliteit der Trypanosomen ook aanzienlijk zou verhoogen, wanneer een spoor van een 0,3 % oplossing aan versch bloed wordt toegevoegd ⁷⁾.

Omtrent deze quaesties heb ik een nader onderzoek ingesteld, door glucose, respectievelijk serum en *HCl*, aan het citraatbloed toe te voegen. Van een gunstige werking van serum en *HCl* heb ik niets kunnen bespeuren. Daarentegen kon ik een gunstige werking van glucose op den duur der beweeglijkheid waarnemen, een enkele maal ook op den duur der virulentie. Beide werden verlengd.

Dit onderzoek betrof alleen pathogene Trypanosomen.

¹⁾ Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasen, 1912, p. 81, 86, 453.

²⁾ Yakimoff, Centralblatt f. Bakteriologie, 1904, XXXVII, S. 669.

³⁾ Levaditi et Sevin, Comptes Rendus de la Société de Biologie, t. LVIII, 1905, p. 664.

⁴⁾ Laveran et Pettit, Comptes Rendus de la Société de Biologie, t. CXLIX, 1909, p. 500.

⁵⁾ Jaffé, Centralblatt f. Bakteriologie I, t. LV, 1910, p. 319.

⁶⁾ Schern, Arbeiten a.d. Kaiserlichen Gesundheitsamte, Bd. 38, 1912, S. 338

⁷⁾ Von Prowazek, Archiv für Entwicklungsmechanik, t. XXV, 1908, S. 643.

Deze kunnen, in tegenstelling met het Tryp. Lewisi, in vitro slechts een klein aantal dagen, *nooit langer dan 5—6 dagen*, in leven worden gehouden, *onverschillig welke de temperatuur is*, waarbij men ze bewaart ¹⁾.

Volgens Bruce ²⁾ is het bloed van dieren, aan Nagana lijdende, nog 4 dagen infectieus, nadat het in vitro is opgevangen, indien het niet is uitgedroogd; uitgedroogd bloed kan nog na 24 uur infectieus zijn, maar dat is uitzondering.

In praeparaten met paraffine langs de randen, hebben Plimmer en Bradford ³⁾ soms na 5 dagen nog levende Nagana-trypanosomen gezien.

Laveran en Mesnil ⁴⁾ kregen geen constante resultaten. Ze vingen bloed, Nagana-trypanosomen bevattend, steriel op, mengden dit met gecitreerd physiologisch water en bewaarden het op kamertemperatuur. Na 3 dagen was het bloed soms nog virulent, maar ze zagen ook, dat bloed, gedurende slechts 48 uur bewaard, zijn virulentie verloren had.

De inoculatie met bloed, dat 3—5 dagen in de ijskast bewaard was, gaf herhaaldelijk negatieve resultaten; zelfs kunnen de resultaten negatief zijn, wanneer nog enkele Trypanosomen *een weinig beweeglijk zijn*.

Terwijl nu uit bovenstaande onderzoekingen van Laveran en Mesnil blijkt, dat het er eigenlijk al heel weinig toe doet of het Tryp. Brucei bij kamertemperatuur ($\pm 20^{\circ}$ C.) of bij de temperatuur van de ijskast ($5^{\circ} - 8^{\circ}$ C.) gehouden wordt, is het toch wel volgens een onderzoek van Yakimoff ⁵⁾ duidelijk, dat de temperatuur wel degelijk ook invloed heeft. Hij ging na, welke temperatuur en welk milieu

¹⁾ Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasés, 1912, p. 83.

²⁾ Bruce, Preliminary and further report on the tsé-tsé fly disease or Nagana in Zululand, 1895, 1897.

³⁾ Plimmer and Bradford, Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. 26, 1899. S. 44.

⁴⁾ Laveran et Mesnil, Bulletin de l'académie de Médecine, XLVII, 1902, p. 648.

⁵⁾ Yakimoff, Centralblatt f. Bakteriologie, 1904, XXXVII. S. 669.

het beste was voor het bewaren van *Tryp. Brucei* en *Tryp. equinum*. Hij defribineerde het bloed, mengde het òf met physiologisch water òf met paardeserum of met beide tezamen en bracht het op 0°, 20° en 36° C.

De optimum temperatuur bleek de kamertemperatuur (20° C.) te zijn en het beste milieu: gedefribineerd bloed gemengd met paardeserum. Zoo kon hij ze 6 dagen in leven houden.

Evenmin als Laveran en Mesnil verkregen ook Kanthack, Durham en Blandford¹⁾, die eveneens met het *Tryp. Brucei* experimenteerden, constante resultaten. Gewoonlijk bleven de Trypanosomen niet langer dan 1—3 dagen in leven en slechts bij uitzondering 4—6 dagen.

Evenals het *Tryp. Brucei* is ook het *Tryp. Evansi*, dat de *Surra* der paarden en runderen verwekt, weinig resistent, wanneer het bloed, gedefribineerd of gemengd met physiologische Na-citraatoplossing, op kamertemperatuur bewaard wordt.

Bij 5°—7° C. gehouden, vindt men na 3 dagen Trypanosomen, die hun vorm bewaard hebben, maar die of onbeweeglijk of zeer weinig beweeglijk zijn en die hun virulentie hebben verloren²⁾.

Wat het bewaren van het *Tryp. equiperdum* betreft, daarover geven de onderzoeken van Yakimoff³⁾ eenig licht en volgens hem ligt de beste temperatuur voor het bewaren van *Tryp. equiperdum* in de buurt van 0° C., waarbij de Trypanosomen, gemengd met gecitreerd physiologisch water 3 dagen, bij kamertemperatuur slechts 2 dagen in leven blijven.

Gaan we nu na, wat er in de literatuur te vinden is over het leven der Trypanosomen bij een temperatuur beneden 0° C., dan blijkt, dat in een *bevroren milieu*, de Trypano-

¹⁾ Kanthack, Durham and Blandford, Proceedings of the Royal Society, Vol. LXIV, 1908, p. 100.

²⁾ Laveran et Mesnil, Annales de l'Institut Pasteur, 1902, p. 1.

³⁾ Yakimoff, Comptes Rendus de la Société de Biologie, t. LXI, 1906, p. 631.

somen een zekere resistentie hebben; maar ze sterven zeer spoedig en wel, naar velen meenen, *des te vlugger, naarmate de temperatuur lager is* ¹⁾.

Dit blijkt ook uit een reeds aangehaald, overigens zeer onvoldoend beschreven, onderzoek van Jürgens ²⁾ in het Archiv für Hygiene, waarin hij zegt: „Ich hatte Gelegenheit, „das Tryp. Lewisi sehr lange ausserhalb des Tierkörpers „lebens- und infectionsfähig zu erhalten. Selbst bei — 5° bis „— 8° C. blieben sie mehrere Tage lang im mikroskopischen „Präparat lebend. Sogar nach siebentägigem Verweilen bei „dieser Aussentemperatur konnten noch bewegliche Trypanosomen im aufgetauten Präparat gefunden werden.

„In einem Kältegemisch von — 17° C. starben die Flagellaten ab und durch Impfungen mit solchem Blut, welches „2 Stunden lang in dieser Kältemischung gestanden hatte, „konnte keine Infection mehr erreicht werden”.

De invloed van de temperatuur blijkt uit dit onderzoek dus wel zeer duidelijk, want, terwijl het Tryp. Lewisi, bij 5°—8° C. bewaard, zelfs 53 dagen lang levend en infectieus bleef (bladz. 8), gaven entingen met bloed, dat 2 uur bij — 17° C. gehouden was, geen infectie meer.

Terwijl Jürgens bij het beschrijven van zijn proeven alleen de temperatuur en den bewaartijd opgeeft, maar verder niets zegt over het medium, waarin het Tryp. Lewisi zich bevond, of hoe hij die lage temperaturen gekregen heeft, zijn Laveran en Mesnil ³⁾, die deze proeven herhaald en uitgebreid hebben, in dat opzicht uitvoeriger. Deze onderzoekers plaatsten een buisje gecitreeerd rattenbloed, sterk met Tryp. Lewisi geïnfecteerd, gedurende 2 uur in een mengsel van ijs en zout (temp. — 15°5 tot — 18°5 C.) daarna verwarmden ze het bloed tot op kamertemperatuur. De meeste Trypanosomen waren onbeweeglijk, enkele goed beweeglijk. Een

¹⁾ Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis, 1912, p. 84.

²⁾ Jürgens, Archiv für Hygiene, Bd. 42, 1902, S. 265.

³⁾ Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis, 1912, p. 84 en 272.

intraperitoneale enting met een hoeveelheid van $\frac{1}{2}$ c.c. van dit bloed bij een rat, gaf een hevige infectie, na een incubatie van $6\frac{1}{2}$ dag.

Het Tryp. Lewisi is ook, volgens dezelfde onderzoekers, in staat zekeren tijd weerstand te bieden aan de temperatuur van vloeibare lucht. Gecitreed rattenbloed, gedurende 15 minuten bij -191° C. gehouden, infecteerde een rat in een hoeveelheid van $\frac{1}{3}$ c.c. intraperitoneaal ingebracht, na een incubatie van 5 dagen.

De minderheid der Trypanosomen was beweeglijk gebleven, welke exemplaren over het algemeen goed van uiterlijk waren, de rest was onbeweeglijk met een gegranuleerd voorkomen.

Bloed gedurende 15 minuten bij -191° C. gehouden, daarna tot op kamertemperatuur verwarmd en nagedurende 1 uur bij -191° C. gehouden, infecteerde een rat, indien $\frac{1}{2}$ c.c. intraperitoneaal werd ingebracht. De incubatietijd was nu 6 dagen.

In een microscopisch praeparaat was met moeite een beweeglijk Trypanosoom te vinden.

Toen het bloed nog langer, nu 24 uur, bij -191° C. gehouden was, bleken alle Trypanosomen gezwollen en entingen gaven geen resultaat meer.

Van de lage wintertemperatuur in Petersburg maakte Yakimoff ¹⁾ gebruik voor het afkoelen van het Tryp. Lewisi. Hij deed bloed, deze Trypanosomen bevattend, in capillair-buisjes en plaatste die buiten in de sneeuw bij een begintemperatuur van $-17,5^{\circ}$ C.

Na 48 uur waren nog levende Trypanosomen aanwezig, na 62 uur werden slechts doode Trypanosomen gevonden.

Bij een tweede proef kreeg hij het volgende resultaat:

's Middags werd bloed in capillair-buizen buiten gezet. De temperatuur was -11° C., die in den nacht steeg tot -2° C. De Trypanosomen leefden nog op den middag van den tweeden dag en eerst in den namiddag van den derden dag waren geen levende Trypanosomen meer te vinden.

¹⁾ Yakimoff, Zeitschrift für Hygiene und Infectiouskrankheiten, Bd II, 1907.

Bij nog lagere temperatuur, in een mengsel van sneeuw en zout leefden ze slechts zeer korten tijd.

Toen het rattenbloed, in capillairbuisjes ingesmolten, zich in het mengsel bevond, was de temperatuur -19°C. , na 10 minuten -20°C.

Bij nauwkeurig nazoeken van een microscopisch praeparaat, gemaakt van bloed, dat 25 minuten bij deze temperatuur gehouden was, werd slechts 1 Trypanosoom gevonden, dat door zijn trage beweging de ijskristallen uiteenschoof.

Na 1 uur bij -19°C. geweest te zijn, waren geen beweeglijke Trypanosomen meer te zien.

Wel toont ook dit onderzoek aan, dat Tryp. Lewisi slecht bestand is tegen den invloed van temperaturen, die schommelen tusschen -2°C. en -20°C. , maar Yakimoff mat slechts de temperatuur bij het begin van zijn proeven, terwijl toch b.v. de tweede proef enkele dagen duurde en de gebruikte buitentemperatuur zeer sterk schommelde. Bovendien beging hij de fout, dat hij naar beweeglijke Trypanosomen ging zoeken in materiaal, dat bevroren geweest en niet voldoende verwarmd was en zodoende aan de Trypanosomen de gelegenheid ontnam om van de doorgestane koude weer eenigszins op hun verhaal te komen, wat blijkt uit het vinden van een exemplaar, dat door zijn trage bewegingen de ijskristallen uiteenschoof. Ook is het niet zeker, dat de gevonden onbeweeglijke Trypanosomen werkelijk afgestorven waren, daar Yakimoff geen entproeven vermeldt.

Zijn er dus in de literatuur enkele gegevens te vinden over het afkoelen beneden 0°C. van het, door velen voor niet-pathogeen gehouden, Tryp. Lewisi, eveneens kunnen ook voor de pathogene Trypanosomen enkele onderzoekingen dienaangaande worden vermeld.

Zoo zeggen Laveran en Mesnil ¹⁾ van het Tryp,

¹⁾ Laveran et Mesnil, Annales de l'Institut Pasteur, 1902, p. 1.

Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis, 1912, p. 454.

Brucei, dat, moge dit Trypanosoom een ietwat langdurige, lage temperatuur, als de temperatuur van de ijskast (bladz. 11), slecht verdragen, het daarentegen toch zeer wel bestand is tegen plotselinge afkoelingen tot -50°C. , zelfs tot -191°C.

Ze verrichtten de volgende proeven, waarbij steeds gebruik werd gemaakt van rattenbloed, rijk aan Tryp. Brucei, verdund met gecitreerd physiologisch water.

Bij de eerste proef hielden ze het bloed, gedurende $\frac{1}{2}$ uur bij een temperatuur, die schommelde tusschen -15° en -18°C.

Bij een volgende was gedurende 20 minuten de temperatuur -15°C. , en vervolgens hielden ze het bloed gedurende 8 minuten bij -25° tot -30°C.

De begin-temperatuur bij de derde proef was ook -15°C. , maar de tijd werd nu verlengd tot 30 minuten, waarna het bloed nog 5 minuten bij -50° tot -55°C. gehouden werd.

De vierde proef was, wat tijd en temperatuur betreft, geheel gelijk aan de derde, maar nu werd het bloed, na de afkoeling snel, in plaats van langzaam, zooals bij de vorige proeven, tot op kamertemperatuur ($19^{\circ}-20^{\circ}\text{C.}$) verwarmd.

Ten slotte onderworpen ze het bloed gedurende 5—25 minuten aan de temperatuur van vloeibare lucht (ongeveer -190°C.)

In de 4 eerste gevallen vonden ze in het bloed, dat ontdooid en verwarmd werd tot op kamertemperatuur, 2 uur daarna, veel Trypanosomen, die normaal waren van beweging en uiterlijk.

Of in het bloed, dat aan de temperatuur van vloeibare lucht blootgesteld was geweest, beweeglijke Trypanosomen gevonden werden, vermelden de onderzoekers niet.

De muizen, in de conjunctivaalplooï met het afgekoelde bloed geënt, zijn aan Nagana gestorven, evensnel als de contrôle-muizen, behalve die van de vierde proef, waar een achterblijven was op de contrôle.

Jammer is het, dat de onderzoekers hier niet vermelden, hoe die temperaturen verkregen zijn en hoe groot de incubatie-tijd was bij de geënte muizen.

Van het *Tryp. Evansi*, den verwekker der Surra bij paarden en runderen, zeggen Kolle en Wassermann,¹⁾ de gegevens aanhalende, die Laveran en Mesnil in hun handboek vermelden, dat het *Tryp. Evansi* zich tegenover lage temperaturen verhoudt, evenals het *Tryp. Brucei*.

Laatstgenoemde onderzoekers, die voorzoover ik heb kunnen nagaan, de eenige geweest zijn, die proeven namen over den invloed van vloeibare lucht op den levensduur der Trypanosomen, zagen, dat bloed van Guineesche biggetjes, met het *Tryp. Evansi* geïnfecteerd, na 15 minuten bij -191° C. te zijn gehouden, nog virulent was, want 2 muizen, met dit afgekoelde bloed geënt, bleken na 6 en 8 dagen besmet te zijn en stierven na 15 en 18 dagen²⁾.

Hetgeen Laveran en Mesnil berichten³⁾ over het afkoelen van het *Tryp. dimorphon*, dat, evenals het *Tryp. Evansi*, voornamelijk paarden en runderen aantast, maar welke Trypanosomensoort niet op het Laboratorium voor Vergelijkende Pathologie aanwezig is, lijkt mij voor mijn eigen onderzoekingen van groot belang, omdat dit blijkbaar het eenige pathogene Trypanosoom is, dat deze onderzoekers *gedurende vrij langen tijd* aan de temperatuur van vloeibare lucht hebben blootgesteld, wat uit het volgende blijkt.

Rattenbloed, rijk aan Trypanosomen, dat, vóór de afkoeling, in een dosis van 2 druppels een muis in 13 dagen doodde, werd gedurende 15 minuten bij -191° C. gehouden.

Na deze afkoeling was het grootste deel der Trypanosomen dood; toch waren er enkele levend gebleven, want een dosis van $\frac{1}{2}$ c. c. van dit bloed, doodde een muis in 27 dagen, een andere in 32 dagen.

Gedurende 1 uur bij -191° C. gehouden, waren nog

1) W. Kolle und A. von Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Zweite Auflage, Siebenter Band, Jena Gustav Fischer, 1913 p. 372.

2) Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasés, 1912, p. 368.

3) Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasés, 1912, p. 611.

zeer enkele parasieten goed beweeglijk; maar 2 muizen, elk met 1 c. c. van dit bloed geïnoculeerd, werden niet meer ziek.

Na 24 uur bij — 191° C. te zijn afgekoeld, liet een microscopisch praeparaat slechts gezwollen Trypanosomen zien, die niet meer virulent waren, daar de, met 1 c. c. van dit bloed geënte muizen, niet meer geïnfecteerd werden. De, met dit gedurende 1 en 24 uur afgekoelde bloed, geïnoculeerde muizen, hadden geen immuniteit verworven, d. w. z. een nieuwe infectie met virulente Trypanosomen van dezelfde soort slaagde.

HOOFDSTUK II.

EIGEN ONDERZOEK.

I. De gebruikte Trypanosomen-soorten.

De, in het Laboratorium voor Vergelijkende Pathologie, aanwezige Trypanosomen-soorten waren:

a. *Tryp. Lewisi*. Een, uit Amsterdam toegezonden, bruine scheepsrat (*Mus decumanus*) bleek bij onderzoek sterk geïnfecteerd met het *Tryp. Lewisi*. Met bloed van deze rat zijn toen verschillende witte en bonte ratten intraperitoneaal geënt, die zonder uitzondering alle geïnfecteerd werden.

Enkele dieren zijn eenigen tijd na de enting gestorven. Bij de sectie bleken ze sterk vermagerd en hun lever en milt meer of minder gezwollen te zijn, terwijl het hartebloed een groot aantal Trypanosomen herbergde.

De oorzaak van den dood moet dus zeer waarschijnlijk wel aan de Trypanosomen-infectie toegeschreven worden, daar geen andere oorzaak kon worden aangetoond.

Ook enkele proefdieren van Rabinowitsch en Kempner¹⁾ stierven aan de infectie met het *Tryp. Lewisi*, zoodat de rangschikking van deze Trypanosomen onder de niet-pathogene soorten niet geheel juist is.

Laatstgenoemde onderzoekers, die voor hun proeven hoofdzakelijk witte en bonte ratten gebruikten, zeggen, dat deze dieren spontaan nooit met het *Tryp. Lewisi* geïnfecteerd worden, terwijl toch algemeen aangenomen wordt, dat bij de wilde ratten hoofdzakelijk een bepaalde rattenvloo

¹⁾ Rabinowitsch und Kempner, Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, Bd. 30, 1899, S. 251.

(*Ceratophyllus fasciatus*) als de overbrenger van deze Trypanosomen fungeert.

Toch zou het, met het oog op entingsproeven in 't algemeen met deze Trypanosomensoort, van groot belang zijn, te weten, of witte en bonte ratten nooit spontaan, b.v. met behulp van rattenvlooien, geïnfecteerd worden, daar de resultaten van dergelijke proeven dan meer zekerheid omtrent al of niet bestaande immuniteit van deze dieren zouden verschaffen.

In 't bijzonder zou deze kennis voor de uitslagen van de, hierachter beschreven, eigen proeven van belang geweest zijn, daar dan een negatief resultaat van een enting, "met afgekoelde Lewisi-Trypanosomen, niet toegeschreven zou kunnen worden aan een eventueele verkregen immuniteit van het geënte dier, ten gevolge van een vroeger plaats gehad hebbende spontane infectie met dezelfde parasieten. Immers is een rat, die van de infectie met Lewisi-Trypanosomen genezen is, niet meer te infecteeren, is refractair tegen een tweede enting met deze Trypanosomen.¹⁾ Eveneens zou een positief resultaat van een enting dan te wijten kunnen zijn aan een ongeveer gelijktijdige, spontane infectie door bijv. de rattenvloo, daar toch zoowel de niet opzettelijk geïnfecteerde als de geënte ratten, hoewel in afzonderlijke kooien en glazen gehuisvest, sterk door vlooiën geplaagd werden.

Toch kan ook ik een infectie van witte en bonte ratten met het Tryp. Lewisi, door de vlooiën moeilijk aannemen, daar het dan wel zeer vreemd zou zijn, dat alle, met niet afgekoeld geïnfecteerd bloed, geënte ratten na eenigen tijd de Trypanosomen herbergden, dus niet immuun bleken te zijn, terwijl van de ratten, geënt met afgekoeld materiaal, sommige wel, andere weer niet, geïnfecteerd werden.

Dit laatste ben ik geneigd toe te schijnen aan den invloed van den tijd en de temperatuur, gedurende welken en waarbij het Tryp. Lewisi afgekoeld werd.

¹⁾ Kanthack, Durham and Blandford, Proceedings of the Royal Society, Vol. LXIV, pag. 100.

b. *Tryp. Evansi*, verwekker der *Surra*, vooral van paarden en runderen, wordt langs zuiver mechanischen weg, door bloedzuigende vliegen overgebracht. Welke soorten de natuurlijke overbrengers van de infectie zijn, is nog niet bepaald uitgemaakt. In 't algemeen worden *Tabaniden* daarvan beschuldigd, maar toch schijnen ook *Stomoxys*-soorten daarvoor in aanmerking te komen. Ook zijn infecties van knaag- en roofdieren waargenomen door het eten van vleesch van gestorven of gedooide geïnfecteerde dieren.¹⁾

Deze stam, in Maart 1921 door Dr. M. Bakker uit Parijs (Institut Pasteur) meegebracht, was aanvankelijk voor caviae zeer virulent. Terwijl de Parijsche cavia (door Prof. Mesnil geënt) 4 maanden na de enting nog leefde en steeds een groot aantal Trypanosomen herbergde, stierven in het begin alle, van af dat dier, geënte Guineesche biggetjes binnen 30 dagen na de enting aan de infectie. In September 1921 moest de stam, wegens gebrek aan caviae, op ratten worden geënt, die in 14—25 dagen aan de infectie stierven. In deze periode was de stam ook voor muizen zeer virulent.

Na 3 passages door ratten, werd weer op cavia cobaya teruggéënt, waarna de stam plotseling voor deze dieren niet-pathogeen bleek te zijn. Wel vertoonden ze, na telkens herhaalde entingen met veel materiaal, Trypanosomen in hun bloed, maar steeds in gering aantal en zeer traag van beweging, terwijl de geënte dieren in leven bleven.

Dergelijke gevallen van het veranderen van de virulentie der Trypanosomen na passages door een andere diersoort, dan die waarin ze eenigen tijd achtereen gehouden zijn, worden ook in de literatuur beschreven. Zoo zag Mej. Fellmer²⁾, dat een Nagana-Trypanosoom, dat een tijdlang de rat als gastheer gehad had, voor deze dieren minder en minder virulent werd, na 1 passage door den egel.

¹⁾ F. Doflein, Lehrbuch der Protozoenkunde, Vierte Auflage, Jena, Gustav Fischer, 1916, S. 531.

²⁾ Fellmer, Centralblatt für Bakteriologie, I, Originale, t. XLV, 1907, p. 512.

Een dergelijk feit berichten ook Laveran en Mesnil¹⁾, dat nu het *Tryp. equiperdum* betrof.

Een virus, dat regelmatig de muis in 5—10 dagen doodde, werd gedurende 2 à 3 maanden op de cavia overgeënt; hierna weer in de muis terug geënt, bleek het minder en minder actief, zoodat de muizen tenslotte slechts een lichte infectie vertoonden, die in genezing eindigde, en het virus verloren was.

Zooals hierboven gezegd is, kon de cavia met onze Surrastam nog wel geïnfecteerd worden, maar witte muizen bleken geheel refractair te zijn.

Door deze geringe pathogeniteit konden de proeven met het *Tryp. Evansi* niet verder worden voortgezet, daar de dieren, in casu Guineesche biggen, die het bloed voor de proeven moesten leveren, moeilijk te besmetten waren en bovendien uit oeconomische overwegingen verder niet voor entingen met afgekoeld materiaal in aanmerking konden komen.

Wel bleek de stam voor honden en konijnen nog virulent te zijn, maar voor uitgebreide proeven, waren ook deze dieren, om geldelijke redenen, ongeschikt.

c. *Tryp. equiperdum*, verwekker der *Dourine* bij paarden, is het eenige, tot nu toe bekende, Trypanosoom, dat door contact-infectie wordt overgebracht.

De stam is, in April 1921, door Prof. de Jong uit Londen meegebracht.

Ook is nog een *Dourine*-stam aanwezig, afkomstig uit het laboratorium van Prof. de Blieck te Utrecht, die echter minder virulent is, dan de stam uit Londen, om welke reden laatstgenoemde stam voor de proeven werd genomen.

d. *Tryp. Venezuelense*. Rangel²⁾ publiceerde in 1905

¹⁾ Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasés, 1912, p. 124.

²⁾ Rangel. Nota preliminar sobre la Peste Boba y la Desrengadera de los Llanos de Venezuela, Labor. del Hosp. Vargas, bull. No. 2, Caracas, 1905, pp. 11—39, 2 pl.

(Citaat naar Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasés, 1912, p. 511.)

een onderzoek over een ziekte der paarden in Venezuela, bekend onder den naam van *Peste Boba*, wanneer de ziekte verliep als een Pernicieuse Anaemie, als *Hermosura*, wanneer er ook oedemen bij optraden en als *Desrengadera*, wanneer paretische of paraplegische verschijnselen bij de ziekte optraden.

In het bloed van zieke dieren vond hij een Trypanosoom, dat hij identificeerde als *Tryp. equinum* (*Mal de Caderas*).

Mesnil kwam op grond van morphologische verschillen en kruisimmunitet tot een andere conclusie en gaf deze parasiet den naam van *Tryp. Venezuelense*.

Hoe de dieren geïnfecteerd worden, is tot nu toe niet bekend.

In Juni 1920 is deze stam door Prof. de Jong uit Parijs meegebracht.

e. *Tryp. Brucei* is de verwekker der *N(a)gana*, en tast vooral runderen en paarden aan. Ze wordt door bloedzuigende *Tsétsé-vliegen* (*Glossina palpalis*, *morsitans*, *tachinoïdes*, *brevipalpis*, *fusca*, *pallidipes*) overgebracht, en in wier darmstelsel, Hypopharynx en Proboscis de ontwikkeling der parasieten ook plaats heeft ²⁾.

Oorspronkelijk is deze stam ook afkomstig uit het Institut Pasteur te Parijs, van waar in 1913 een geïnfecteerde muis naar Leiden werd gezonden. Prof. de Jong heeft van af deze muis, zoowel te Leiden als te Utrecht andere dieren geënt, zoodat de stam op 2 plaatsen in het leven wordt gehouden, te Utrecht, na het vertrek van daar van Prof. de Jong in 1915, door Prof. de Blicq. De thans in Leiden aanwezige stam werd in 1917 uit Utrecht gekregen.

II. De toegepaste temperaturen.

Terwijl het verkrijgen van lage temperaturen op een niet speciaal daarvoor ingericht laboratorium, tot ongeveer -78°C . minimaal, de temperatuur van vast koolzuur, koolzuursneeuw genaamd, weinig of geen moeite oplevert, is het constant

²⁾ F. Doflein, Lehrbuch der Protozoënkunde 1916, pag. 527.

Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis 1912, p. 55.

houden van die temperaturen uiterst lastig en vaak onmogelijk.

Wil men nog lagere temperaturen gaan gebruiken, dan zijn die met betrekkelijk geringe hulpmiddelen niet te verkrijgen en is men aangewezen op laboratoria, die uitgerust zijn met vakkundig personeel en de benodigde machinale installaties. De volgende temperaturen zijn voor het nemen der proeven gebruikt:

1. *De temperatuur van de ijskast* die, zooals uit langdurige proefnemingen gebleken is, schommelt tusschen 4° en 8° C. De schommelingen worden iets kleiner, wanneer men zorg draagt, dat de ijsvoorraad zoo groot mogelijk blijft en de deur van de kast zoo min mogelijk wordt geopend.

2. *De temperatuur van een z.g.n. Frigo-ijskast*, een isoleer-materiaal bevattende houten bak, waarin een zinken trommel, die omgeven is met een mengsel van ijs en zout, welke temperatuur schommelt tusschen -3° C. en -16° C. Door de te groote temperatuur-schommelingen, zijn de proeven, nadat enkele hiermee genomen waren, niet verder voortgezet.

Wel bestaat er ook op het laboratorium een groote Frigo, die prachtig werkt, maar deze kon, omdat daarin de koepokstof bewaard wordt, voor deze proeven niet worden gebruikt.

3. *De temperatuur van een vriestank*. Dit apparaat, bestaande uit een ijzeren binnenmantel en een houten buitenmantel, waartusschen kurkisolatie, is oorspronkelijk bestemd voor het afkoelen van visch, volgens de methode van Ottesen.

De tank was gevuld met een 20% keukenzoutoplossing, die afgekoeld werd door een ammoniak-koelmachine. Deze voorziet, behalve de vriestank, ook nog 2 koelruimten. Met behulp van buizen en klepsluitingen is de inrichting zoodanig, dat afwisselend de tank en de koelruimten kunnen worden afgekoeld. In de tank gaat de aanvoerbuis over in een, in verschillende windingen langs de wanden gelegen, stelsel van buizen. Midden in de tank is de spil van een roerapparaat, waarvan de vleugels zich langs den bodem bewegen. Links en rechts van de spil van dit roerapparaat blijft een

rechthoekige ruimte over, waarin de, met bloed gevulde, buisjes door middel van touwtjes werden opgehangen.

De spil van het roerapparaat heeft van boven een kamrad, dat ingrijpt in een ander, welk laatste gedreven wordt door een electromotor van $\frac{1}{2}$ P.K. De afvoerende koelbuis loopt ongeveer parallel met de aanvoerleiding, maar mondt uit in de zuigleiding van de machine.

Een met goede photo's voorziene beschrijving door Prof. Dr. D. A. de Jong, is te vinden in de Mededeelingen en Verslagen van de Visscherij-inspectie, No. 25, p. 58.¹⁾

Zoo veel mogelijk werd getracht de temperatuur van de keukenzoutoplossing op -20°C . te houden, wat vrijwel gelukte, mits, vooral in den zomer, de machine bleef doordraaien.

Natuurlijk waren bij de proeven, die langer dan 12 uur duurden, lichte temperatuursschommelingen, om redenen van technischen aard, niet te ontgaan, die echter op den uitslag der proeven niet den minsten invloed gehad kunnen hebben, daar, zooals blijken zal, alle gebruikte Trypanosomen-soorten binnen 4 uur bij deze temperatuur reeds gestorven waren.

4. De temperaturen, te verkrijgen met een *toestel van Cailletet*.

Met dit toestel zou men, door absoluten alcohol met vloeibaar koolzuur af te koelen, temperaturen kunnen bereiken tot -72°C . De *Cryogène de Cailletet* bestaat uit een vernikkeld koperen bak, waarin een holle spiraal loopt, van hetzelfde materiaal vervaardigd. Deze spiraal, afsluitbaar door een metalen kraan, kan men aansluiten aan een koolzuurcylinder, terwijl het tegenovergestelde einde van de spiraal weer boven den bak uitmondt. De bak vult men met absoluten alcohol, waaraan de warmte onttrokken wordt door het, in de spiraal gasvormig geworden, vloeibare koolzuur uit den cylinder.

Met eenige moeite is een temperatuur van -20°C . tot

¹⁾ Prof. Dr. D. A. de Jong. Conserveering van visch door kunstmatige koude. Tweede Rapport omtrent de onderzoekingen voor betere methoden voor de Conserveering van visch door kunstmatige koude.

— 30° C. in dit goed geïsoleerde apparaat nog wel constant te houden, maar bij lagere temperaturen stopt herhaaldelijk het toestroomen van het koolzuur, door ijsvorming om de kraan, waardoor het constant houden van die temperaturen onmogelijk wordt.

Het toestel, door Prof. Blanksma bereidwillig in bruikleen gegeven, is gebruikt om gedurende korten tijd bij — 20° C. het bloed af te koelen, wanneer de vriestank om de een of andere reden niet gebruikt kon worden. Bovendien is van het toestel gebruik gemaakt om het Tryp. Lewisi bij — 30° C. af te koelen.

5. *Een temperatuur van — 65° C.* is gemaakt door koolzuur-sneeuw in een cilindrisch vacuumglas met aether te overgieten. Ik kon echter de temperatuur niet constant houden en daarom is ook met deze temperatuur slechts 1 proef genomen.

6. *Temperaturen van — 145° C.,* mij met groote welwillendheid verschaft op het *Physisch Laboratorium* door Prof. Kamerlingh Onnes, en den Conservator Dr. Crommelin.

— 145° C. is een willekeurig genomen, constante, lage temperatuur, die verkregen werd in een toestel, Cryostaat genaamd, waarvan hier een korte beschrijving volgt.

Het toestel bestaat uit 2 cylindervormige vacuumglazen. Onder in de vloeibare lucht, waarmede het eerste glas voor een deel gevuld is, wordt gasvormige lucht geblazen, die in bellen naar boven stijgt; men bereikt hierdoor, dat de vloeibare lucht met een bepaalde, regelbare snelheid verdampt. De verdampte lucht stroomt vervolgens door een vacuumbuis, die de beide vacuumglazen verbindt, naar het tweede glas, koelt daar de proefbuis tot de gewenschte temperatuur af en ontwijkt tenslotte door een buisje in de kap, die het glas van boven sluit.

De koude, gasvormige lucht, die in het eerste glas ongeveer de temperatuur van, onder atmosferischen druk kokende lucht (d. i. ongeveer — 193° C.) heeft, verliest op haar weg naar en ook in het tweede (onverzilverde) glas, een deel van

haar koude; hoe harder men dus blaast, tot des te lager temperatuur zal de proefbuis in het tweede glas afgekoeld worden.

Door regelen van den gasstroom kan men op deze wijze zeer nauwkeurig op de gewenschte temperatuur instellen. Het beginsel, waarop de werking berust, zal hiermede wel duidelijk zijn; de beschrijving der constructieve details is natuurlijk weggelaten.

Het oorspronkelijke apparaat, naar het voorbeeld waarvan het boven beschreven, sterk vereenvoudigde toestel door personeel van het Fysisch Laboratorium geconstrueerd is, vindt men afgebeeld en beschreven in de „Verslagen van de gewone vergaderingen der Wis- en Natuurkundige Afdeeling van de Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam” ¹⁾.

Het toestel werkt voortreffelijk en de temperatuur is zonder veel moeite op $0,01^{\circ}$ à $0,02^{\circ}$ C. constant te houden. Een bezwaar bij het nemen van afkoelingsproeven met Trypanosomen was, dat, zoowel bij het inbrengen als bij het uithalen der met bloed gevulde buisjes, de temperatuur in de proefbuis vrij belangrijk steeg. Geschiedt de manipulatie echter snel, dan bereikt de temperatuur na eenige minuten weer haar oorspronkelijke waarde.

7. *De temperatuur van vloeibare lucht.*

Aangezien lucht geen enkelvoudige stof, maar een mengsel is, hangt de waarde van het kookpunt af van het gehalte aan elk der componenten. Versch gecondenseerde lucht heeft een kookpunt van ongeveer -193° C. Laat men vloeibare lucht echter lang staan, dan zal de vluchtige stikstof daaruit sneller verdampen dan de minder vluchtige zuurstof, zoodat men tenslotte een vloeistof overhoudt, die nog slechts weinig stikstof bevat en waarvan de temperatuur dus niet veel van die van het kookpunt van zuurstof (-183° C.) zal verschillen.

¹⁾ H. Kamerlingh Onnes en C. A. Crommelin, Amsterdam, Jan. 1921, No. 154c.

Wanneer in het vervolg, zonder meer, van „de temperatuur van vloeibare lucht” sprake zal zijn, zal daarmee de een of andere temperatuur tusschen -193°C. en -183°C. bedoeld worden.

Voor korten tijd durende proeven haalde ik met goedvinden van Prof. Kamerlingh Onnes de lucht van af het Fysisch Laboratorium, voor proeven van langeren duur bracht ik de buisjes met bloed naar dat laboratorium, waar ze in groote kolven met vloeibare lucht, die geregeld bijgevuld werden, opgehangen werden.

III. Gevolgde techniek.

Voor het verkrijgen van het, voor de proeven benodigde, geïnfecteerde bloed, werden in 't begin verschillende methoden toegepast.

De, op het laboratorium meest gebruikelijke, manier om aan een cavia een *belangrijke* hoeveelheid bloed te ontnemen, was die uit de *arteria carotis*. De cavia wordt daarvoor op een plank gebonden en de *arteria carotis* voor een gedeelte blootgelegd, hetwelk dan aan het perifere einde met een zijden draad wordt dichtgebonden. Een tweede draad wordt om het centrale einde gelegd, doch nog niet dichtgesnoerd en daarna wordt met een puntig schaartje de arterie tusschen de 2 draden ingeknipt. Het bloed, dat dan uit de wond spuit, wordt opgevangen en zoodra een voldoende hoeveelheid verkregen is, wordt de tweede draad om het vat dichtgeknoopt en de huidwond al of niet met hechtingen gesloten. Deze manier van opvangen was voor mijn proeven minder geschikt, daar het bloed op die manier sterk verontreinigd werd, tenzij uiterst omvangrijke voorzorgen werden genomen.

Om dit alles te ontgaan werd de methode gewijzigd. Het perifere eind van de blootgelegde arterie werd weer met een draad dichtgebonden, maar het centrale eind met een klemmetje dichtgedrukt. Nu werd in het midden van het aan beide zijden gesloten arterie-stuk een  vormige wond gemaakt, waarin een steriel, fijn uitgetrokken glazen

buisje werd gestoken en in het vat centraalwaarts een eindje opgeschoven, waarin het nu door een draadligatuur gefixeerd werd. Werd nu het klemmetje verwijderd dan golfde het bloed uit het buisje, dat men dan, om de coagulatie te verhinderen in steriele natrium-citraatoplossing (H_2O , 1000 gr.; NaCl, 5 gr.; Na-citraat, 5 gr.) kon opvangen.

Wanneer echter verwacht werd, dat de Trypanosomen (met name het Tryp. Lewisi) verscheidene dagen in leven zouden blijven, werd aan de Na-citraat 1% glucose toegevoegd, daar glucose op het bewaren van Trypanosomen, volgens Biot en Richard, een gunstigen invloed uitoefent, wat ook uit de hierachter beschreven en reeds op bladz. 9 aangegeuide proeven blijkt.

Op bovenbeschreven wijze werd nu het bloed wel in den regel steriel opgevangen, maar de manier was omslachtig; daarom werd overgegaan tot het doen van *hartpunctie*.

Hiervoor werd eerst de plaats van den ictus cordis bepaald, dat plekje kaalgeknipt en met joodtinctuur gedesinfecteerd. Een scherpe naald werd met een rukje daar ter plaatse ingestoken en nu het bloed in een steriele recordspuit opgezogen en daarna in een steriele Petri-schaal met gelijke deelen natrium-citraatoplossing gemengd.

Deze manier mislukte vaak, was dus niet zeker en de dieren stierven nog al eens tengevolge van de operatie. Toen werd overgegaan tot hartpuncteeren, door middel van een vrij dikke punctienaald, met kort geslepen schuine insteekopening, waarbij als insteekplaats ook de plaats gekozen werd, waar de ictus cordis het duidelijkst was te voelen.

Het uit de naald komende bloed kon ook nu zeer gemakkelijk vrij steriel worden opgevangen, door de cavia met operatieplank en al een kwartslag te draaien.

Het verdunde bloed werd vervolgens opgevangen in gewijzigde *Pasteur'sche pipetten* (beschreven door Beek ¹⁾)

¹⁾ Beek, Invloed van temperaturen tot $-20^{\circ} C.$ op toxische en atoxische dysenterie-bacteriën. Acad. proefschrift, Leiden, 1919, p. 28.

die aan beide kanten werden dichtgesmolten. Daar echter deze pipetten bij snel onderdompelen in vloeibare lucht, dikwijls stuk sprongen, werden later voor deze proeven zeer dunne, glazen buisjes gebruikt (lengte 10 cM., glasdikte 0,1 mM., doorsnee 1,2 mM., inhoud $\frac{1}{8}$ c.c.) die binnen den tijd van 1 minuut in de vloeibare lucht ondergedompeld konden worden zonder stuk te springen. In deze buisjes werd het geïnfecteerde bloed met een gummiballon opgezogen.

In alle, aan beide kanten toegesmolten, pipetten en buisjes werd een luchtbel gelaten van ongeveer $\frac{1}{5}$ van de lengte van het buisje. Dit met het oog op de volumetoeneming, die het verdunde bloed door het bevroren bij temperaturen beneden 0° zou ondergaan.

Na afkoeling in de vriestank of in het toestel van Cailletet, moest nog de voorzorg worden genomen de buisjes af te drogen, om te verhinderen, dat soms bij het uitgieten der buisjes op de horlogeglazen een druppeltje keukenzoutoplossing of absoluten alcohol van de oppervlakte van het buisje zou afvallen en de Trypanosomen zou dooden. Dit afdrogen was natuurlijk niet noodig, wanneer de buisjes uit ijskast, Frigo, Cryostaat of vloeibare lucht kwamen, daar de buisjes dan droog waren.

Na zeer korten tijd bij -20° , -145° of -190° te zijn geweest, was de inhoud der dunne buisjes geheel bevroren en moest het, voordat het kon worden uitgegoten, worden ontdooid, hetgeen gebeurde door de buisjes tusschen de vingers te wrijven.

Om *het al of niet virulent zijn* van het afgekoelde bloed te kunnen nagaan, werd het, nadat het op steriele horlogeglazen was uitgegoten, in een recordspuitje, dat tevoren gedesinfecteerd was, door achtereenvolgens spuit en naald door te spuiten met 5% Carbol, 70% Alcohol, Aether en steriel physiologisch zoutwater, opgezogen en intraperitoneaal bij witte muizen geënt.

Ter controle werd een muis geënt met dezelfde hoeveelheid, maar *versch, niet afgekoeld* materiaal.

Om te kunnen nagaan, welke *veranderingen in beweging*

en *uiterlijk* bij de Trypanosomen, na hun afkoeling, waren opgetreden, werd van de achtergebleven rest op het horlogeglas, nadat het ongeveer 5 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, een vochtig, ongekleurd dekglas-paeparaat (vaak ook een gekleurd paeparaat) gemaakt.

Zodoende dacht ik de fout van Yakimoff (bladz. 15) geheel te vermijden, die het bloed, direct na de afkoeling onderzocht, wanneer de Trypanosomen nog veel te veel onder den invloed der koude verkeerden.

Alle geënte muizen werden, zodra de contrôle-muis Trypanosomen in het perifere (staart-)bloed vertoonde, daarna op verschillende tijdstippen op Trypanosomen nagezien.

Daar een infectie met het Tryp. Lewisi bij witte muizen, die zoo goed als refractair zijn voor niet gecultiveerde Tryp. Lewisi ¹⁾, zeer moeilijk aanslaat, werd het, met deze Trypanosomen geïnfecteerde bloed, bij witte of bonte ratten geënt.

Alle geënte gestorven dieren werden geseceerd en ook dan het hartebloed, zoo noodig ook lever en milt, op Trypanosomen nagezien.

Was een geënt dier gestorven, zonder dat tijdens het leven ooit Trypanosomen gevonden waren, dan werd eerst op agar en bouillon geënt uit hart, lever, milt en nier, om te zien of soms een bacteriële doodsoorzaak te vinden was. Daarna werden gekleurde praeparaten (kleuring volgens G i e m s a) gemaakt en werden ook hierin geen Trypanosomen gevonden, dan werd aangenomen, dat het dier niet aan de Trypanosomen-infectie was gestorven.

Waren de, met afgekoeld materiaal, geënte dieren na 30 dagen nog Trypanosomen-vrij, dan werd aangenomen, dat de Trypanosomen door de inwerking der koude gestorven, of wel avirulent waren geworden. De dieren werden dan opnieuw, tegelijk met een contrôle-dier, met *virulent*, versch materiaal geënt, om te zien of ze soms eenige immuniteit verworven hadden.

¹⁾ Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis, 1912, p. 258.

Op dit vraagstuk der immuniteit ben ik later gekomen door de reeds beschreven afkoelingsproeven (bladz. 18) van Laveran en Mesnil met het Tryp. dimorphon, terwijl immunisatie-proeven in 't algemeen, met verzwakt virus, in de literatuur beschreven zijn, waarop later bij de gevolgtrekkingen zal worden teruggekomen.

Het in leven houden van de Trypanosomen-soorten, door het voortkweeken in dieren, eischt een groot aantal proefdieren. Om dit aantal niet noodeloos te vergrooten, werd hoofdzakelijk gebruik gemaakt van de Trypanosomen in het bloed van deze stam-dieren op een tijdstip, waarop van deze laatste, voor het behouden van de Trypanosomen-soort, weer moest worden overgeënt op een verschier. Daarom is de volgorde der beschreven proeven niet dezelfde, als waarin ze chronologisch werden genomen.

IV. Verloop der proeven in 't algemeen.

Bij het nemen der proeven, werd in het begin uitgegaan van de, door Laveran en Mesnil, verkondigde stelling, dat in 't algemeen de Trypanosomen in vitro des te sneller sterven, naarmate de temperatuur lager is en in 't bijzonder de pathogene-soorten slechts een klein aantal dagen, nooit langer dan 5—6 dagen, in leven gehouden kunnen worden, onverschillig, hoe de temperatuur is, waarbij men ze bewaart.¹⁾

Voor alle aanwezige Trypanosomen-soorten werd nu eerst de levensduur nagegaan, wanneer ze bij de temperatuur van de ijskast werden bewaard. Ik meende, zodoende, meteen eenig inzicht te krijgen over hun levensduur bij lagere en zeer lage temperaturen.

Vervolgens werd bij — 20° C. de tijdgrens gezocht, waarbij de Trypanosomen afstierven.

Bij de zeer lage temperaturen van vloeibare lucht, zou dus deze tijd nog veel en veel korter moeten zijn.

¹⁾ Laveran et Mesnil, Trypanosomes et Trypanosomiasis, 1912, p. 24, 83 et 84.

Ik begon deze onderzoeken met het Tryp. Evansi, door het geïnfecteerde bloed, dat 4 dagen bij $4^{\circ} - 8^{\circ} \text{C.}$ infectieus bleef, gedurende 5—20 minuten bij -193°C. af te koelen en het afgekoelde bloed bij muizen te enten.

Het resultaat was anders dan ik verwacht had. Want, hoewel ik beweeglijke Trypanosomen entte, gingen de muizen niet aan de infectie dood, maar bleken na eenigen tijd immuun te zijn geworden tegen een hernieuwde enting met versch virulent materiaal (bladz. 48).

Intusschen was de zomer-vacantie begonnen, gedurende welken tijd ik geen vloeibare lucht krijgen kon en daarna bleek deze stam niet meer pathogeen te zijn (bladz. 21).

Toen werd getracht met het Tryp. equiperdum, na afkoeling in vloeibare lucht, eveneens muizen te immuniseeren, wat echter niet gelukte; evenmin is dat het geval geweest met het later onderzochte Tryp. Venezuelense en het Tryp. Brucei.

In de ijskast ($4^{\circ} - 8^{\circ} \text{C.}$) bleef het Tryp. equiperdum 2 dagen en in de vriestank (-20°C.) 3 uur infectieus, terwijl na 5—25 minuten in vloeibare lucht geweest te zijn, het bloed eveneens nog infectieus was, want alle met dit bloed geënte muizen stierven aan de infectie, doch 2 muizen, geënt met bloed, dat 30 minuten afgekoeld was geweest, bleven in leven.

Dit aanvankelijke resultaat, reeds medegedeeld in eene vergadering van de Microbiologische Vereeniging, te Delft gehouden op 17 December 1921, en waaruit scheen af te leiden, dat inderdaad de sterke afkoeling in vloeibare lucht de Trypanosomen sneller zou dooden, dan *hoogere lage* temperaturen, is de oorzaak geweest van een aantal eerst slecht begrepen resultaten van proeven met het Tryp. Venezuelense en het Tryp. Brucei.

Want ik meende, dat het Tryp. equiperdum na afkoeling gedurende 30 minuten bij de temperatuur van vloeibare lucht *gestorven was*, temeer, omdat ik ook bij het microscopisch onderzoek geen beweeglijke Trypanosomen gevonden had.

Ik begon daarna weder het Tryp. Venezuelense en het Tryp. Brucei van 5—30 minuten in vloeibare lucht af

te koelen, en thans gingen de geënte muizen aan de infectie dood, dus de Trypanosomen waren niet gestorven.

De afkoelingstijd werd toen langer en langer genomen, en de afgekoelde Trypanosomen bleven voor muizen virulent, ook toen ik na 30 minuten afkoelen geen beweeglijke exemplaren meer gezien had.

Een toevallige omstandigheid deed mij toen verder de waarheid van bovengenoemde stelling van Laveran en Mesnil (bladz. 32) betwijfelen.

Tijdens proeven met vloeibare lucht waren enkele buisjes, gevuld met Nagana-bloed, van de draadjes, waaraan ze waren opgehangen, losgeraakt doordat ze, juist onder die draadjes, waren stukgesprongen. De stukken lagen dus nu op den bodem van het vacuumglas en bleven daar tot den volgende morgen. Want uit vrees voor het springen van dat vacuumglas, werd het, na afloop der proeven, niet direct schoongemaakt, maar werd daarmee gewacht, totdat alle vloeibare lucht daaruit was verdwenen. Het bloed, stijf bevroren, was dus in de stukken van de buisjes uren aan de inwerking van vloeibare lucht blootgesteld geweest. Een microscopisch vochtig dekglas-praeparaat liet geen beweeglijke Trypanosomen zien, maar in een gekleurd praeparaat waren talrijke exemplaren te vinden, die normaal van uiterlijk waren. Een met dit bloed geënte muis stierf na 9 dagen aan de infectie.

De proeven werden nu voortgezet, maar ik wachtte nu in plaats van 5 minuten (bladz. 31) tenminste $\frac{1}{4}$ uur, nadat het bloed bij kamertemperatuur gehouden was, voor ik naar beweeglijke Trypanosomen ging zoeken, omdat ik mij niet kon voorstellen, dat de Trypanosomen na urenlange afkoeling, wel nog virulent zouden zijn, maar geen beweging meer zouden vertoonen, wanneer ze slechts 30 minuten waren afgekoeld geweest.

Het bleek nu, dat, terwijl het Tryp. Brucei na 3 dagen in de ijskast en na $3\frac{3}{4}$ uur in de vriestank geweest te zijn gestorven was, het de temperatuur van vloeibare lucht dagen en weken verdroeg, *zonder dat het noemenswaard in virulentie achteruitging*, terwijl ik bovendien steeds beweeglijke

exemplaren in een vochtig ongekleurd dekglas-praeparaat kon vinden.

Ook het Tryp. equiperdum en het Tryp. Venezuelense bleken zeer goed bestand tegen de inwerking van de zeer lage temperatuur van vloeibare lucht.

Is, met het bovenstaande, het algemeen verloop der proeven beschreven, zoo dient thans nog iets gezegd te worden over het microscopisch onderzoek van afgekoelde Trypanosomen.

Zoodra Trypanosomen 1—2 dagen in de ijskast zijn afgekoeld geweest, vindt men, bij het bekijken van een vochtig, ongekleurd dekglas-praeparaat te midden van goed beweeglijke, slanke exemplaren, steeds talrijke parasieten, die onbeweeglijk, vaak gezwollen en slecht begrensd zijn.

Wordt de afkoelingstijd langer en langer, dan wordt ook het aantal schimmen en het aantal onbeweeglijke, van uiterlijk veranderde Trypanosomen steeds grooter, totdat op een gegeven oogenblik nog slechts enkele, uiterst zwak hun flagel bewegende, plat-ovaal-ronde exemplaren te vinden zijn, die dan al of niet meer infectieus zijn.

Bekijkt men onder het microscoop een dekglas-praeparaat, gemaakt van een druppeltje geïnfecteerd bloed, vermengd met een druppel psysiologische keukenzoutoplossing, dan ziet men de slanke Trypanosomen met snelle bewegingen door het gezichtsveld krioelen, daarbij de bloedlichaampjes opzij schuivend en ietwat ronddraaiend.

Bij een minder juiste instelling van het microscoop verraden dan juist de bloedlichaampjes de aanwezigheid der parasieten.

Deze oriëntering mist men in praeparaten, die gemaakt zijn van bloed, dat eenigen tijd beneden 0° C. afgekoeld en dus bevroren is geweest; het bloed is dan gehaemolyseerd, wat kenbaar is aan de helderroode, doorschijnende kleur, die het heeft aangenomen.

De Trypanosomen verkeerden na de afkoeling blijkbaar nog eenigen tijd onder den invloed van de doorgestane koude, want dikwijls kan men door middel van het microscoop zien, dat Trypanosomen, die eerst zwak beweeglijk waren,

langzamerhand, wanneer ze meer en meer onder invloed van de hogere kamertemperatuur komen, in beweeglijkheid toenemen. Het is dus gewenscht, het bloed eenigen tijd bij kamertemperatuur te houden, voordat men in een praeparaat naar beweeglijke Trypanosomen gaat zoeken.

In 't begin nam ik hiervoor ongeveer 5 minuten, maar het bleek dat deze tijd te kort genomen was, waarom ik het bloed later minstens $\frac{1}{4}$ uur bij kamertemperatuur liet staan.

Het hangt van de temperatuur en den tijd van afkoeling af, hoe groot het aantal nog beweeglijke Trypanosomen is dat, in vergelijking met het aantal exemplaren zonder eenige eigen beweging, in het praeparaat is te zien.

Bewaarden de pathogene Trypanosomen bij $4^{\circ} - 8^{\circ} \text{C}$. gehouden, meestal langer hun beweeglijkheid dan hun virulentie, bij het houden bij -20°C . en voorzoover ik heb nagegaan, ook bij -40°C . en bij -145°C . heb ik opgemerkt, dat dit juist andersom is en zijn de Trypanosomen nog virulent, terwijl ze reeds lang hun beweeglijkheid verloren hebben. Dit is dus een bevestiging van het reeds op bladz. 4 geciteerde gezegde van Laveran en Mesnil, dat beweeglijke Trypanosomen vaak het vermogen tot vermenigvuldiging verloren hebben en dat onbeweeglijke Trypanosomen niet altijd dood zijn.

Ik heb reeds vermeld, dat alle geënte en daarna gestorven dieren geseceerd werden. Bij alle dieren, die tijdens hun leven Trypanosomen in het perifere bloed vertoonden, bleken de lever en de milt meer of minder sterk gezwollen te zijn en waren in het hartebloed de parasieten, al of niet meer beweeglijk, te vinden. Vooral de gezwollen milt was zeer karakteristiek voor de infectie en wanneer dan ook bij de sectie van een geënt dier, dat bij het leven nooit Trypanosomen vertoond had, een kleine, niet gezwollen (lever en) milt gevonden werd, dan was dit, naast het niet vinden der Trypanosomen, een reden te meer om de oorzaak van den dood niet in de Trypanosomen-infectie te zoeken.

V. Trypanosoma Lewisi.

a. Temperatuur: $4^{\circ} - 8^{\circ}$ C. (Ijskast).

Een aantal buisjes, gevuld met sterk geïnfecteerd rattenbloed, door hartpunctie verkregen en verdund met glucose-natrium-citraatoplossing, werd in de ijskast bewaard. Hiervan werd 1 maal per week een monster onderzocht om na te gaan of er nog beweeglijke Trypanosomen te vinden waren.

Na 1 week waren de Trypanosomen niets in beweeglijkheid verminderd, na 2 weken werden conglomeraten van 2—21 exemplaren gevonden, terwijl de afzonderlijke parasieten nog een zeer snelle beweging vertoonden. Na 3 weken waren duidelijke veranderingen op te merken, zoowel in beweeglijkheid en uiterlijk voorkomen der Trypanosomen als in het bloed zelf. Wel was het aantal goed beweeglijke parasieten nog zeer groot, maar enkele exemplaren bewogen zich niet of bijna niet meer en waren, naar het scheen, gezwollen en gegranuleerd, terwijl het aantal conglomeraten sterk verminderd was. Het aantal normaal uitzijnde roode bloedlichaampjes was verminderd, wat bleek uit de talrijke schimmen daarvan.

Langzamerhand verminderde nu het aantal goed beweeglijke Trypanosomen, de conglomeraten verdwenen geheel en het aantal roode bloedlichaampjes verminderde eveneens meer en meer.

Na 43 dagen waren nog steeds goed beweeglijke Trypanosomen te vinden en nu werd een rat geënt met $\frac{6}{10}$ c. c. van dit bloed, welk dier 7 dagen na de enting enkele Trypanosomen in het perifere bloed vertoonde.

De contrôle-rat was gebleken 4 dagen na de enting met Trypanosomen geïnfecteerd te zijn.

Na een bewaartijd van 49 dagen waren nog steeds enkele goed beweeglijke, slanke Trypanosomen te vinden. Een rat, nu geënt met $\frac{7}{10}$ c. c. bloed, stierf 25 dagen na de enting aan een absces in de linkerlong, zonder dat ooit Trypanosomen in het perifere bloed gevonden waren.

De etter uit het absces bevatte gram-positieve staafjes, die niet nader onderzocht zijn.

Nadat het bloed 56 dagen in de ijskast geweest was, konden geen beweeglijke Trypanosomen meer gevonden worden, terwijl een volgens Giemsa gekleurd praeparaat slechts gezwollen exemplaren deed zien.

Een enting is niet meer gedaan.

Om nu de werking van *glucose* op het bewaren van het Tryp. Lewisi na te gaan werd, naar het voorbeeld van Biot en Richard, rattenbloed, gemengd met natrium-citraat-oplossing met en zonder 1% glucose, in de ijskast bewaard, nadat een rat ter contrôle geënt was met $\frac{1}{2}$ c. c. versch bloed, welk dier 5 dagen na de enting Trypanosomen in het perifere bloed vertoonde.

In bloed, waaraan glucose was toegevoegd, werden, nadat het 29, 35 en 50 dagen in de ijskast gestaan had, steeds beweeglijke Trypanosomen gevonden, hoewel ook hier, evenals dat bij de vorige proef het geval was, het aantal beweeglijke Trypanosomen steeds verminderde.

De rat geënt met $\frac{1}{2}$ c. c. bloed, dat 29 dagen in de ijskast geweest was, vertoonde 10 dagen na de enting, veel Trypanosomen in het staartbloed en stierf 46 dagen na de enting.

Bij de sectie werden als eenige afwijkingen gevonden: sterke vermagering, matig gezwollen lever en milt, vrij veel Trypanosomen in het hartebloed.

Een enting bij een rat met $\frac{1}{2}$ c. c. bloed, dat 35 dagen in de ijskast gestaan had, bleek 8 dagen na de enting een lichte infectie veroorzaakt te hebben, terwijl de rat, geïnoculeerd met $\frac{7}{10}$ c. c. bloed, dat 50 dagen in de ijskast gestaan had, nooit Trypanosomen in het perifere bloed vertoonde, evenmin na de herenting met versch materiaal. Deze rat bleek dus immuun te zijn geworden, daar de contrôle, tegelijk geënt, 5 dagen na de enting geïnfecteerd bleek te zijn.

In bloed zonder glucose echter waren na 35 dagen geen beweeglijke exemplaren meer te vinden. Een enting met $\frac{6}{10}$ c. c. van dit bloed bij een rat, had geen resultaat, en

7 dagen na de herenting met versch materiaal, bleek het dier geïnfecteerd en was dus niet immuun.

Uit de proeven blijkt dus:

- 1^o. dat het Tryp. Lewisi, in de ijskast bewaard, een groot aantal dagen in leven bleef;
- 2^o. dat het aantal dagen, waarna nog beweeglijke Trypanosomen gevonden werden, niet altijd even groot was;
- 3^o. dat glucose op het leven van Tryp. Lewisi in de ijskast bewaard, een gunstigen invloed had;
- 4^o. dat beweeglijke Lewisi-Trypanosomen niet altijd infectieus waren;
- 5^o. dat de incubatie-tijd door het afkoelen langer werd;
- 6^o. dat de rangschikking van het Tryp. Lewisi onder de niet-pathogene soorten, waarschijnlijk niet geheel juist is.

b. Temperatuur: — 20° C. (Cryogène de Cailletet).

Terwijl het Tryp. Lewisi zeer langen tijd een temperatuur van 4° — 8° C. verdraagt, sterven ze bij — 20° C. gehouden zeer spoedig.

In rattenbloed, 1 uur bij die temperatuur gehouden, was de beweging der slanke parasieten nog zeer goed. Een, met 1/2 c. c. van dit afgekoelde bloed geënte rat, bleek besmet te zijn na een incubatie van 7 dagen, met een achterblijven van 6 dagen op de contrôle-rat.

Na 1 uur en 20 minuten bij deze temperatuur te zijn geweest, waren nog enkele Trypanosomen zwak beweeglijk en normaal van uiterlijk, maar een rat, met 1/2 c. c. van dit bloed geënt, werd niet meer geïnfecteerd.

31 dagen na deze enting werd dezelfde rat opnieuw besmet met 1/2 c. c. versch geïnfecteerd bloed; 8 dagen na de hernieuwde enting waren enkele Trypanosomen in het bloed te vinden; 14 dagen daarna konden geen Trypanosomen meer gevonden worden.

Het blijkt dus dat het Tryp. Lewisi, na 1 uur en 20 minuten bij — 20° C. geweest te zijn, hoewel nog zwak beweeglijk, niet meer infectieus was.

c. **Temperatuur: — 30° C. (Cryogène de Cailletet).**

Na 1 uur bij — 30° C, gehouden te zijn, werden in een praeparaat voor het meerendeel slanke, goed beweeglijke Trypanosomen gevonden. Twee ratten, elk met $\frac{7}{10}$ c. c. van dit bloed geënt, vertoonden nooit Trypanosomen in het perifere bloed. Na 37 dagen werden beide ratten opnieuw geënt met 1 c. c. versch bloed, maar zonder resultaat. Bij een contrôle-rat was het resultaat na 1 dag positief.

Deze ratten bleken dus door de eerste enting immuun te zijn geworden.

De rest van het bovenvermelde bij — 30° C. afgekoelde materiaal werd in de ijskast bewaard. Na 50 dagen werd een praeparaat gemaakt, waarin 1 parasiet gevonden werd, die duidelijk de zweepdraad bewoog; het uiterlijk van het dier was gezwollen en het protoplasma gegranuleerd. Een, met dit materiaal, geënte rat, bleef Trypanosomen-vrij. 4 dagen na de herenting, met 1 c. c. versch bloed, die 32 dagen na de eerste enting plaats vond, werden in het perifere bloed, enkele Trypanosomen gevonden, terwijl een contrôle-rat eveneens na 4 dagen besmet bleek te zijn.

Van eenige immuniteit was dus bij de opnieuw geënte rat geen sprake.

d. **Temperatuur: — 190° C. (vloeibare lucht).**

Nadat uit andere onderzoekingen was gebleken, dat de beschikbare pathogene Trypanosomen dagen lang bij de temperatuur van vloeibare lucht beweeglijk en virulent bleven, heb ik ook het Tryp. Lewisi aan de inwerking van die zeer lage temperatuur onderworpen.

Direct bleek al, bij het bekijken van een dekglas-paeparaat van bloed, dat 1 uur bij — 190° C. geweest was en daarna ruim $\frac{1}{2}$ uur bij kamertemperatuur had gestaan, dat de beweeglijkheid der parasieten enorm verminderd was, want ik kon in het geheele praeparaat slechts 1 exemplaar vinden, dat zich zwak bewoog.

Een rat, met $\frac{1}{2}$ c. c. van dit bloed geënt, bleek na 9 dagen sterk besmet te zijn (met een achterblijven van 8 dagen op de contrôle-rat). Het dier stierf na een tijdsverloop van 26 dagen, terwijl de contrôle-rat in leven bleef. Bij de sectie werd niets anders gevonden dan sterke vermagering, iets gezwollen lever en milt, en Trypanosomen in het hartebloed.

In bloed, dat 2 uur in vloeibare lucht geweest was, werden geen beweeglijke Trypanosomen meer gezien, evenmin in bloed, dat gedurende 18 uur, 4 dagen en 8 dagen in vloeibare lucht geweest was.

Entingen bij ratten hadden geen succes, terwijl herentingen niet zijn verricht.

Het Tryp. Lewisi bleek dus, na 1 uur bij -190°C. gehouden te zijn, nog beweeglijk en infectieus, want in het bloed waren nog zwak beweeglijke exemplaren te vinden en de rat, met dit bloed geënt, was 9 dagen na de enting besmet.

Na 2 uur en langer bij de temperatuur van vloeibare lucht te zijn geweest, werden in het bloed geen beweeglijke exemplaren meer gevonden en het bloed was niet meer infectieus, want entingen gaven geen resultaat meer.

De incubatie-tijd werd door het afkoelen sterk verlengd, want, terwijl de contrôle-rat 1 dag na de enting reeds Trypanosomen in het bloed vertoonde, was dat bij de rat, met het afgekoelde bloed geënt, pas na 9 dagen het geval.

Uit den dood van deze laatste rat blijkt weder, dat de plaatsing van het Tryp. Lewisi onder de niet-pathogene soorten niet geheel juist is.

VI. *Trypanosoma Evansi.*

a. Temperatuur: 4° — 8°C. (IJskast).

Voor een gemakkelijk overzicht der verkregen resultaten scheen het mij thans gewenscht, die in tabelvorm te ver-eenigen en deze tabellen telkens toe te lichten.

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
1	"	"	4	7
2	vertraagd ¹⁾	iets gezwollen ²⁾	6	9
3	zeer zwak	gezwollen	6	9
4	geen	"	—	blijft in leven
5	"	"	—	" " "

¹⁾ Bedoeld wordt de snelheid der beweging van beweeglijke parasieten, vergeleken met de snelheid der Trypanosomen in een druppel versch bloed, welke laatste als „normaal” wordt aangeduid.

²⁾ Vergeliken met het aspect der parasieten in een druppel versch bloed, hetwelk als „normaal” wordt beschouwd.

Bij een Surra-rat, die 3 dagen te voren geënt was, werd hartpunctie gedaan en het bloed met natrium-citraatoplossing gemengd. Het bloed, in buisjes opgezogen, werd in de ijskast geplaatst, nadat dadelijk ter contrôle een muis was geënt met $\frac{1}{2}$ c. c. van het versche materiaal.

De Trypanosomen, zeer groot in aantal in het geënte bloed, verschenen daarbij 1 dag na de enting in het perifere (staart-)bloed en het dier stierf 3 dagen na de enting aan de infectie.

Nadat het bloed 24 uur in de ijskast geweest was, werd een muis geënt met een hoeveelheid van $\frac{1}{2}$ c. c. De Trypanosomen waren normaal van beweging en uiterlijk. 4 dagen na de enting waren de eerste Trypanosomen in het staartbloed van de muis aan te toonen en het dier stierf 3 dagen daarna aan de infectie.

Met den dag verminderde nu de beweeglijkheid der parasieten sterk en na 4 dagen waren geen beweeglijke exemplaren meer te vinden. Hun uitwendig voorkomen veranderde eveneens snel, en zelfs na 2 dagen waren geen Trypanosomen meer te vinden, die er normaal uitzagen. De incubatie-tijd werd door het afkoelen langer en de muizen stierven 3 dagen, nadat de Trypanosomen in het staartbloed verschenen waren.

Bij een tweede proef, op dezelfde wijze genomen, bleven de Trypanosomen 4 dagen infectieus en 5 dagen beweeglijk, terwijl ook hier de beweeglijkheid geregeld afnam.

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
1	"	"	3	7
2	iets verminderd	"	4	8
3	goed	"	5	7
4	zeer verminderd	iets gezwollen	6	8
5	zwak	gezwollen	—	blijft in leven
6	geen	"	—	" " "

Het uiterlijk der parasieten veranderde in de tweede proef minder snel, vandaar misschien ook de langer durende virulentie, die hier 4 dagen bleef bestaan. De incubatie-tijd werd langer, naarmate het bloed langer afgekoeld was en de dood van de geënte muizen volgde in 2—4 dagen, nadat de Trypanosomen in het staartbloed verschenen waren.

Was in deze beide proeven het bloed alleen gemengd met een oplossing van natriumcitraat, bij een derde werd nagegaan welken invloed glucose en konijnenserum op het leven van het Tryp. Evansi had.

Daarvoor werd cavia-bloed in Na-citraat oplossing opgevangen; bij een gedeelte hiervan werd 1 % glucose toegevoegd en bij een ander deel normaal konijnenserum.

Het resultaat is uit achterstaande tabel gemakkelijk te zien.

Een duidelijk levensverlengenden invloed op de Trypanosomen heeft noch de glucose noch het konijnenserum getoond. Zelfs scheen dit laatste een minder gunstige uitwerking te hebben, daar de muis, geënt met bloed + serum, hetwelk 4 dagen in de ijskast gestaan had, in leven bleef, en ook geen beweeglijke Trypanosomen in het geënte bloed gevonden werden.

De muizen geënt met bloed, vermengd met Na-citraat-oplossing alleen, of wel met glucose vermengd, stierven aan

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
1	"	"	2	5
2	iets vertraagd	"	3	4
3 ¹⁾	verminderd	iets gezwollen	5	6
3 ²⁾	"	" "	5	6
3 ³⁾	"	gezwollen	6	8
4 ¹⁾	zwak	"	5	7
4 ²⁾	"	"	4	7
4 ³⁾	geen	"	—	blijft in leven
5 ¹⁾	"	"	—	" " "
5 ²⁾	"	"	—	" " "
5 ³⁾	"	"	—	" " "

¹⁾ = bloed in Na-citraatoplossing opgevangen.

²⁾ = " " " " " " + 1% glucose.

³⁾ = " " " " " " + konijnens serum.

de infectie, terwijl nog zwak beweeglijke Trypanosomen in het geënte bloed, aanwezig waren.

Verder viel in de proeven op de vrij sterk wisselende incubatie-tijd, die door het afkoelen duidelijk werd verlengd.

b. Temperatuur: — 5° C. tot — 11° C. (Frigo).

In een mengsel van ijs en zout, waarin de temperatuur schommelde tusschen — 5° C. en — 11° C. bleef het Tryp. Evansi slechts gedurende 2 dagen beweeglijk, doch was dan niet meer infectieus, wat uit volgende tabel blijkt:

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
1	verminderd	gezwollen	—	blijft in leven
2	zwak	"	—	" " "
3	geen	"	—	" " "
4	"	"	—	" " "

Hoewel dus, na 2 dagen afkoeling bij deze schommelende temperatuur, nog zwak beweeglijke Trypanosomen werden geënt, konden deze de muizen niet meer besmetten. Misschien hebben hier en de lage temperatuur en de schommelingen daarvan samen het virulentie-verlies der Trypanosomen bewerkstelligd.

Geen enkele der in leven gebleven muizen van de beschreven proeven zijn opnieuw geënt geworden, omdat toen nog geen voldoende gegevens aanwezig waren om aan deze quaestie meer aandacht te schenken.

c. Temperatuur: — 20° C. (Cryogène de Cailletet).

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	26
1 1/4	verminderd	"	—	blijft in leven
1 1/2	"	"	—	" " "
1 3/4	"	iets gezwollen	—	" " "
2	"	"	—	7 1)
2 1/4	"	"	—	blijft in leven
2 1/2	zwak	"	—	21 1)

1) Dood niet door Trypanosomen.

In de tabel valt in de eerste plaats op het groote aantal dagen, dat de contrôle-muis nog leeft, nadat de Trypanosomen in het staartbloed zijn aangetoond, wat wijst op een verlies aan pathogeniteit. In de tweede plaats blijkt, dat de beweging der Trypanosomen des te meer verminderde, naarmate de afkoelingstijd langer werd. Ten derde is uit de tabel af te leiden, dat ook het uiterlijk voorkomen der Trypanosomen door het afkoelen was veranderd en tenslotte dat, hoewel enkele muizen, geënt met afgekoeld bloed, stierven, bij geen der muizen ooit Trypanosomen gevonden zijn.

Op bladz. 21 wees ik er reeds op, dat de gebruikte Surrastam, door tusschenschakeling van de rat als gastheer, veel van haar virulentie voor de cavia verloren had en de muizen zelfs refractair bleken te zijn.

Daar deze proef genomen werd met bloed van een rat, die van een cavia was geënt, is het zeer goed te begrijpen, dat de muizen, geënt met afgekoeld bloed, in 't geheel niet meer geïnfecteerd werden, wanneer de contrôle-muis 26 dagen noodig had om aan de infectie te sterven.

De oorzaak van den dood van de andere muizen, die respectievelijk 7 en 21 dagen na de enting stierven, kan niet aan een Surra-infectie worden toegeschreven, daar in hun bloed nooit Trypanosomen werden gevonden. De sectie leverde niets bijzonders op, met name waren de lever en de milt niet vergroot en entingen op agar en in bouillon uit hart, lever, milt en nier gaven geen resultaat.

De 4 overige, in leven gebleven muizen, werden na 31 dagen, tezamen met een contrôle-muis, opnieuw geënt met 1 c. c. versch, geïnfecteerd bloed.

De contrôle-muis bleek na 2 dagen met Trypanosomen besmet te zijn en stierf pas 30 dagen na de enting.

Van de 4 muizen, die opnieuw besmet waren, bleef de eerste steeds vrij van Trypanosomen en bleef in leven. Bij de tweede werden na 14 dagen enkele traag beweeglijke parasieten gevonden, maar zij bleef eveneens in leven. De derde muis werd, evenmin als de eerste, geïnfecteerd en stierf evenmin, terwijl de vierde na 21 dagen ook enkele zwak beweeglijke Trypanosomen herbergde, doch eveneens in leven bleef. Bij een onderzoek, dat 2 maanden later plaats vond, konden bij geen der muizen Trypanosomen gevonden worden.

De muizen respectievelijk geënt met bloed, dat $1\frac{1}{4}$, $1\frac{1}{2}$, $1\frac{3}{4}$ en $2\frac{1}{4}$ uur bij -20° C. was afgekoeld geworden, hadden *dus een geringen graad van immuniteit verworven, die hen beschutte tegen een doodelijke infectie door de enting met versch bloed.*

d. **Temperatuur: — 191° C. (Vloeibare lucht).**

Tijd van afkoeling in minuten.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	3	6
9	verminderd	"	—	blijft in leven
11	"	"	—	" " "
12	"	"	—	" " "
13	"	"	—	" " "
14	"	"	—	" " "
15	"	"	—	" " "
16	"	"	—	" " "
17	"	"	—	" " "

De bovenstaande tabel is het resultaat van een proef, die genomen is vóór die op bladz. 45—46 beschreven en was reeds toen noodig, omdat ik, door de ophanden zijnde groote vacantie, gedurende geruimen tijd verhinderd zou zijn met vloeibare lucht te werken. De proef viel in den tijd, waarin de wisseling van gastheeren nog niet had plaats gevonden. Het bloed werd aan een cavia door middel van hartpunctie ontnomen.

Uit de tabel blijkt:

- 1°. dat het bloed virulent was, want de contrôle-muis stierf 6 dagen na de enting, na een incubatie-tijd van 3 dagen;
- 2°. dat de beweeglijkheid der Trypanosomen na de afkoeling was afgenomen;
- 3°. dat die beweeglijke Trypanosomen normaal van uiterlijk waren;
- 4°. dat de, met het afgekoelde bloed, geënte muizen, niet besmet werden en niet stierven.

Door een vergissing werd bij de hernieuwde infectie, die 29 dagen na de eerste enting plaats had, geen contrôle-muis geënt. Het resultaat wordt in de volgende tabel weergegeven, waarin de muizen 1—8 voorstellen de muizen in de vorige tabel vermeld en die in leven waren gebleven.

Hieruit blijkt, dat de muizen 2 en 6 gestorven zijn, respectievelijk na 20 en 13 dagen. Bij muis 2 waren 4 dagen

Muis No.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
1	—	blijft in leven
2	4	20
3	—	blijft in leven
4	—	" " "
5	10	" " "
6	—	13 ¹⁾
7	—	blijft in leven
8	—	" " "

¹⁾ Dood niet door Trypanosomen.

na de enting Trypanosomen in het staartbloed aangetroffen en bij de sectie werd gevonden: sterk gezwollen lever en milt en veel Trypanosomen in het hartebloed.

De sectie van muis 6 leverde niets bijzonders op; lever en milt waren niet gezwollen, Trypanosomen werden niet gevonden, terwijl ook tijdens het leven nooit Trypanosomen gevonden waren.

Bij muis 5 werden 10 dagen na de herenting Trypanosomen in het staartbloed gevonden. Maar deze parasieten waren niet virulent, want een enting met 6 druppels staartbloed bij een verse muis leverde niets op.

Muis 5 genas van de infectie en bleef in leven.

De muizen 1, 3, 4, 7 en 8 vertoonden nooit Trypanosomen in het bloed en bleven in leven.

Daar bij de herenting geen contrôle-muis was ingespoten, bestaan er 2 mogelijkheden: of de, voor de herenting gebruikte, Trypanosomen waren voor muizen avirulent, of de muizen waren door de enting met de afgekoelde Trypanosomen immuun geworden.

Dat de, voor de herenting gebruikte Surra-Trypanosomen, wel degelijk voor een muis virulent waren, blijkt uit den

dood van muis 2, die aan de infectie gestorven is. Bovendien blijkt de virulentie uit den dood van een muis, die in hetzelfde tijdperk geënt werd met bloed van een cavia, en in 12 dagen aan de infectie is gestorven.

Er moet dus aangenomen worden, dat de in leven gebleven muizen immuun geworden waren, door het inspuiten van Trypanosomen, die in vloeibare lucht afgekoeld waren geworden.

Nadere immunisatieproeven op muizen konden later niet worden verricht, omdat de stam, zooals reeds vroeger medegedeeld is, daarna voor muizen avirulent bleek te zijn geworden.

Dat dezelfde stam toen voor honden nog wel virulent was, blijkt uit de volgende proef:

Twee, ongeveer even zware, jonge honden werden intraperitoneaal ingespoten met $2\frac{1}{2}$ c. c. verdund Surra-bloed van een rat. Hond A werd geënt met bloed, dat 15 minuten in vloeibare lucht (temp.: -190° C.) gestaan had. In het bloed, dat na de afkoeling ongeveer 5 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, werden geen beweeglijke Trypanosomen meer gevonden.

Dit klopt dus niet met de bevindingen van de vorige proef (bladz. 46), waarbij de Trypanosomen, nadat ze 15 minuten bij -191° C. geweest waren, nog wel beweeglijk bevonden werden. Bovendien was bij die proef de temperatuur nog 1° C. lager en had het bloed, na de afkoeling, zeker ook niet langer dan 5 minuten bij kamertemperatuur gestaan, voordat het microscopisch op beweeglijke exemplaren werd nagezien.

Dat dier-entingen ter beoordeeling van het resultaat van de afkoeling bij zulke proeven onmisbaar zijn en de proeven van Yakimoff (bladz. 14 en 15) dus veel van hun waarde verliezen, blijkt hieruit wel zeer duidelijk.

Hond B werd geënt met versch bloed. Hond A bleek na 15 dagen geïnfecteerd en stierf na 53 dagen aan de infectie. Hond B bleek na 7 dagen reeds besmet en stierf na 66 dagen aan de infectie.

Het bloed was dus, ondanks de afkoeling gedurende 15 minuten bij -190°C . nog virulent gebleven, terwijl ik, nadat het 5 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, geen beweeglijke Trypanosomen gevonden heb. De incubatie-tijd werd door de afkoeling met 8 dagen verlengd en de hond, geënt met afgekoeld bloed, stierf nog 13 dagen eerder aan de infectie dan de contrôle-hond.

VII. *Trypanosoma equiperdum*.

a. Temperatuur: $4^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$. (Ijskast).

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	4
1	iets minder	"	4	9
2	zwak	gezwollen	8	11
3	zeer zwak	"	—	6 ¹⁾
4	geen	"	—	blijft in leven
5	"	"	—	" " "

¹⁾ Dood niet door Trypanosomen.

Bij een geïnfecteerde cavia werd hartpunctie gedaan, en het bloed opgevangen in natrium-citraatoplossing. Het verdunde bloed, in buisjes opgezogen, werd in de ijskast bewaard.

Uit de tabel blijkt:

- 1^o. dat de Trypanosomen, naarmate die langer bewaard werden, in beweeglijkheid afnamen;
- 2^o. dat het uiterlijk voorkomen der Trypanosomen na den eersten dag veranderde;
- 3^o. dat de contrôle-muis 1 dag na de enting geïnfecteerd bleek en na 3 dagen aan de infectie stierf;
- 4^o. dat de Trypanosomen 3 dagen beweeglijk en slechts 2 dagen infectieus bleven;
- 5^o. dat de incubatie-tijd door het afkoelen langer werd;

6^o. dat bij de muis, geënt met zwak beweeglijke Trypanosomen, die 3 dagen afgekoeld werden, geen Trypanosomen gevonden werden, terwijl het dier toch stierf. Een doodsoorzaak werd bij de sectie niet gevonden, terwijl entingen op agar en bouillon uit hart, lever, milt en nier geen resultaat gaven.

Bij een tweede proef met het bewaren van het Tryp. Equiperdum in de ijskast, werd nagegaan of glucose of runderserum, aan het, in Na-citraatoplossing opgevangen, bloed toegevoegd, op de Trypanosomen invloed had.

Zooals uit achterstaande tabel is te zien heeft glucose misschien invloed, in dien zin, dat de beweeglijkheid der Trypanosomen iets grooter is in vergelijking met de beweeglijkheid der Trypanosomen in het bloed, waaraan geen glucose of waaraan runderserum was toegevoegd, en evenlang (4 dagen) in de ijskast bewaard was. Van een geringer virulentie-verlies blijkt niets.

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen
0	normaal	normaal	1	3
1	"	"	4	8
2	iets vertraagd	"	4	9
3 ¹⁾	verminderd	iets gezwollen	—	blijft in leven
3 ²⁾	"	"	—	" " "
3 ³⁾	"	"	—	" " "
4 ¹⁾	zwak	gezwollen	—	" " "
4 ²⁾	verminderd	"	—	" " "
4 ³⁾	zwak	"	—	" " "
5 ¹⁾	"	"	—	" " "
5 ²⁾	"	"	—	2 ⁴⁾
5 ³⁾	"	"	—	blijft in leven

¹⁾ = bloed in na-citraatoplossing opgevangen.

²⁾ = " " " " " " " + 1 % glucose.

³⁾ = " " " " " " " + runderserum.

⁴⁾ Dood niet door Trypanosomen.

Bij deze proef waren na 5 dagen bewaren nog zwak beweeglijke Trypanosomen in het bloed te vinden, maar ze waren niet langer dan 2 dagen infectieus.

De muizen, geënt met bloed, dat langer dan 2 dagen in de ijskast geweest was, bleven in leven, behalve de muis, geënt met bloed + glucose, dat 5 dagen bewaard was; deze is aan een etterige peritonitis gestorven.

De in leven gebleven muizen zijn niet opnieuw geënt geworden, om de op bladzijde 44 vermelde redenen.

b. Temperatuur: -20° C.

Tengevolge van de zeer hoge buiten-temperatuur was het niet mogelijk de temperatuur van den absoluten alcohol in het toestel constant te houden, zoodat die schommelde tusschen -20° C. en -19° C.

De muis, ter contrôle geënt met niet afgekoeld bloed, stierf in 5 dagen, met een incubatie-tijd van 1 dag.

Na afkoeling gedurende 1 uur was de beweging der Trypanosomen duidelijk verminderd, maar hun uiterlijk voorkomen was normaal.

Temperatuur: -20° C. tot -19° C. (Cryogène de Cailletet).

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	5
$\frac{1}{2}$	"	"	6	10
$\frac{3}{4}$	"	"	6	10
1	verminderd	"	11	14
$1\frac{1}{4}$	zwak	"	8	13
$1\frac{1}{2}$	"	"	13	15

De incubatie-tijd wisselde vrij sterk en dientengevolge wisselde ook het aantal dagen, waarna de dood van de geënte muizen optrad.

Wel bleek ook hier duidelijk, dat de incubatie-tijd langer werd, wanneer de Trypanosomen werden afgekoeld. Een oorzaak voor het wisselend verschil in incubatie-tijd is misschien te zoeken in de individueele gevoeligheid der geënte muizen. Indien het mogelijk was muizen te enten, waarvan de gevoeligheid voor de infectie steeds even groot was, zou men waarschijnlijk een gelijkmatige toeneming zien van den incubatie-tijd, die afhankelijk zou zijn van den tijd van afkoeling.

Omdat de Trypanosomen, na afkoeling gedurende $1\frac{1}{2}$ uur, niet dood bleken te zijn, werd bij een tweede proef, de tijd verlengd, terwijl de temperatuur gedurende de proef, constant bleef op -20° C.

Het bleek nu, dat het *Tryp. equiperdum* na $2\frac{1}{2}$ uur bij -20° C. geweest te zijn nog steeds voor muizen virulent was. De incubatie-tijd werd, vergeleken met die van de controle-muis, vrij lang, maar wisselde nu ook vrij sterk, terwijl de geënte muizen aan de infectie ten gronde gingen 2—5 dagen, nadat ze besmet waren bevonden.

Temperatuur: -20° C (Vriestank).

Tijd van afkoeling.	Bewegelijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	4
1 uur en 20 min.	zeer zwak	„	3	7
$1\frac{1}{2}$ uur	„ „	„	3	7
1 uur en 40 min.	„ „	„	5	10
1 uur en 50 min.	„ „	„	6	11
2 uur.	„ „	„	6	10
2 uur en 10 min.	„ „	iets gezwollen	11	14
2 uur en 20 min.	geen	„ „	10	12
$2\frac{1}{2}$ uur.	„	„ „	9	11

Van eenige beweging der parasieten was, nadat ze ongeveer 5 minuten bij kamertemperatuur gestaan hadden, niets te bespeuren, terwijl het uiterlijk der beweeglijke Trypanosomen ging veranderen, nadat ze langer dan 2 uur bij -20° C. geweest waren.

Bij een derde proef, werden de muizen die geënt waren met bloed, dat langer dan 3 uur afgekoeld was, niet meer

Temperatuur: — 20° C. (Vriestank).

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	4
2 ¹ / ₂	geen	gezwollen	—	7 ¹⁾
2 ³ / ₄	"	"	—	blijft in leven
3	"	"	13	15
3 ¹ / ₄	"	"	—	blijft in leven
3 ¹ / ₂	"	"	—	" " "
3 ³ / ₄	"	"	—	" " "
4	"	"	—	" " "
16	"	"	—	" " "

¹⁾ Dood niet door Trypanosomen.

geïnfecteerd. Evenmin stierf de muis of vertoonde ooit Trypanosomen, die geënt was met materiaal, dat 2³/₄ uur afgekoeld was. Hier is dus zeer waarschijnlijk tijdens de bewerking een fout begaan, daar de muis, die een injectie gekregen heeft met bloed dat 3 uur was afgekoeld, wel aan de Trypanosomen-infectie gestorven is.

Bij de muis, geënt met bloed, dat 2¹/₂ uur afgekoeld was en die stierf, werden vóór noch ná den dood Trypanosomen gevonden.

Bij de sectie werd het volgende waargenomen: lever en milt waren niet gezwollen, in het hartebloed werden geen Trypanosomen aangetroffen, doch beweeglijke korte en langere staafjes, die volgens de culturen coli-bacteriën bleken te zijn.

30 dagen na de enting werden de in leven gebleven muizen opnieuw, met versch, geïnfecteerd bloed, geënt. De contrôle-muis stierf in 3 dagen, na een incubatie-tijd van ¹/₂ dag en de reeds geënte muizen stierven alle in 3—4 dagen, dus praktisch gesproken even snel als de contrôle-

muis, en hadden blijkbaar geen immuniteit, hoe gering ook, door de eerste enting verkregen.

Het Tryp. equiperdum bleef dus bij -20°C . niet langer dan 3 uur infectieus.

c. Temperatuur: -65°C . tot -39°C .

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	3	7
$1\frac{1}{4}$	twijfelachtig	iets gezwollen	—	4 ¹⁾
$1\frac{1}{2}$	geen	„	5	9
$1\frac{3}{4}$	„	„	9	14
2	„	„	9	11
$2\frac{1}{4}$	„	„	9	13

¹⁾ Dood niet door Trypanosomen.

Onder het hoofdstuk „Toegepaste temperaturen” op bladz. 23 wees ik er reeds op, dat men met eenvoudige hulpmiddelen gemakkelijk lage temperaturen, tot ongeveer -78°C . minimaal, bereiken kan.

Men heeft daarvoor noodig een cylinder met vloeibaar koolzuur, een Dewar-vacuümglas en aether of absoluten alcohol.

De koolzuurcylinder wordt in een statief ondersteboven gezet en men vangt het vloeibare koolzuur dat, na openen van de kraan, uitstroomt en direct vast wordt (koolzuursneeuw), in een doek op, doet de sneeuw in het vacuümglas en overgiet dat met aether of alcohol.

Wil men b.v. -60°C . hebben, dan voegt men, onder gestadig roeren van de meer en meer strooperig wordende vloeistof, net zoolang koolzuursneeuw toe tot die temperatuur bereikt is. Deze temperatuur is echter niet constant, maar stijgt langzamerhand, zoodat, om ze constant te houden, voortdurend, al roerende, wat koolzuursneeuw toegevoegd

moet worden. Hangen echter in deze dunstrooperige vloeistof, dunne glazen buisjes, dan kan niet voortdurend geroerd worden, zonder gevaar te lopen de buisjes stuk te maken.

Tijdens de door mij verrichte proef werd éénmaal koolzuursneeuw toegevoegd, en werd geregeld de temperatuur gemeten, waarvan het lijstje hier volgt.

3.25 uur: — 65° C.	4.45 uur: — 38° C.
3.35 „ : — 49° C.	5.00 „ : — 41° C.
3.42 „ : — 48° C.	5.15 „ : — 40° C.
3.50 „ : — 45° C.	5.25 „ : — 39.5° C.
4.00 „ : — 43.5° C.	5.35 „ : — 39° C.
4.20 „ : — 40° C.	

Voor het inhangen der buisjes, om 3.25 uur, was de temperatuur dus — 65° C. die, doordat er een massa van veel hogere temperatuur bij kwam, steeg tot — 50° C., daarna steeg de temperatuur vrijwel regelmatig totdat om 5.35 uur de temperatuur — 39° C. was.

Uit de afgedrukte tabel is te zien, dat het Tryp. equiperdum hoegenaamd niets in virulentie door de afkoeling verloren had, want alle, met het bloed geënte, muizen stierven aan de Trypanosomen-infectie, behalve de muis geënt met bloed, dat 1 $\frac{1}{4}$ uur afgekoeld geweest was, en die aan een andere oorzaak moet zijn gestorven. Tenminste waren tijdens het leven geen Trypanosomen gevonden en ook de sectie leverde niets bijzonders op.

In het bloed, bij de andere muizen geïnoculeerd, dat ongeveer 5 minuten na de afkoeling bij kamertemperatuur had gestaan, kon ik geen beweeglijke parasieten vinden. Wel werden Trypanosomen gezien, die normaal van uiterlijk waren.

De incubatie-tijd werd ook hier door het afkoelen langer en de geënte muizen stierven in 2—5 dagen, nadat de Trypanosomen in het perifere bloed verschenen waren.

Langer dan 2 $\frac{1}{4}$ uur zijn de Trypanosomen bij deze temperatuur niet afgekoeld.

d. **Temperatuur: — 145° C. (Cryostaat).**

Tijd van afkoeling in minuten.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	2	6
35	verminderd	„	5	8
43	geen	„	6	9
45	„	„	6	11

Nadat het toestel op — 145° C. gebracht was, werden de buisjes met het geïnfecteerde cavia bloed in het toestel gehangen, waardoor de temperatuur steeg tot — 31° C. Na 20 minuten was de temperatuur — 90° C., na 30 minuten — 135° C. en na 38 minuten weer op — 145° C., bij welke temperatuur het toestel nu gehouden werd.

35 minuten daarna werd een aantal buisjes uit het apparaat gehaald en na het ontdooien $\frac{5}{10}$ c. c. bloed bij een muis ingespoten. De Trypanosomen waren in beweeglijkheid verminderd. Nadat het bloed 43 minuten bij — 145° C. geweest was, werd weer een muis geënt, evenzoo na 45 minuten. Beweeglijke Trypanosomen werden niet meer gevonden.

Toch stierven de, met het afgekoelde bloed, geënte muizen aan de infectie, na een incubatie-tijd, die 3—4 dagen langer was dan bij de contrôle-muis.

Verdere proeven zijn bij deze temperatuur niet verricht.

e. **Temperatuur: — 191° C. (Vloeibare lucht).**

Zooals uit de tabel blijkt, stierven de muizen alle aan de infectie, uitgezonderd de muis, geënt met bloed, dat 23 minuten bij — 191° C. gehouden was, en die 1 dag na de enting dood gevonden werd. Bij de sectie werd geen doodsoorzaak gevonden en de culturen op agar en in bouillon uit hart, lever, milt en nier bleven steriel. In bloed, dat 12 minuten en langer afgekoeld was en dat na de afkoeling ongeveer 5 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, konden geen beweeglijke Trypanosomen meer gevonden worden. Toch gingen de geënte muizen een wisselend aantal dagen na de enting dood.

Tijd van afkoeling in minuten.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
8	zwak	"	3	6
9	zwak	"	3	5
12	geen	"	5	8
15	"	"	4	8
18	"	"	9	12
21	"	"	6	9
23	"	"	—	1 ¹⁾
24	"	"	5	7
25	"	"	13	16
30	"	"	—	blijft in leven
30	"	"	—	" " "

¹⁾ Dood niet door Trypanosomen.

Maar 2 muizen, die geënt waren met 0,2 c.c. bloed, dat 30 minuten afgekoeld was, vertoonden nooit Trypanosomen in het staartbloed en bleven in leven.

Ik dacht dus eerst, dat deze Trypanosomen, door ze in vloeibare lucht gedurende $\frac{1}{2}$ uur af te koelen, gestorven waren, temeer, omdat ik geen beweeglijke exemplaren meer gezien had. Toen echter het Tryp. Brucei na dagen lange afkoeling in vloeibare lucht beweeglijk en infectieus bleek te zijn, heb ik ook de proeven met het Tryp. equiperdum voortgezet en voor een deel herhaald met het volgende resultaat. (Zie Tabel blz. 59).

Het bloed, door hartpunctie van een geïnfecteerde cavia verkregen en in Na-citraatoplossing opgevangen, werd in de buisjes gedaan; deze werden dicht gesmolten en naar het Fysisch Laboratorium van *Prof. Kamerlingh Onnes* vervoerd. Ze werden daar, aan dunne draadjes gebonden, in kolven met vloeibare lucht gehangen.

Na 1, 2, 4 enz. dagen werden nu enkele buisjes uit de lucht gehaald, naar het Laboratorium voor Vergelijkende

f. Temperatuur: ongeveer — 190° C. (Vloeibare lucht).

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	4
1	verminderd	„	5	9
2	„	„	4	7
4	„	„	4	7
8	„	„	5	8
16	„	„	5	8
21	„	„	5	11
31	„	„	—	5 ¹⁾

1) Dood niet aan Trypanosomen-infectie.

Pathologie gebracht en daar verder onderzocht. Het afgekoelde bloed werd, nadat het ontdooid was, op steriele horloge-glazen uitgegoten en de muizen geënt met $\frac{3}{4}$ c. c. bloed. Van de achtergebleven rest op het horloge-glas werd, nadat het 15—30 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, een praeparaat gemaakt, waarin steeds beweeglijke Trypanosomen bijna normaal van uiterlijk, werden gevonden. Het meerendeel der parasieten dreef onbeweeglijk rond, in aspect alle overgangen vertoonend van normaal tot gezwollen, en het protoplasma was sterk gegranuleerd.

De muizen vertoonden 4—5 dagen na de enting Trypanosomen in het staartbloed en stierven alle in 7—11 dagen aan de infectie. Alleen de muis, met bloed geïnoculeerd, dat 31 dagen afgekoeld geweest was, stierf in 5 dagen, zonder dat Trypanosomen tijdens het leven gevonden werden. Ook bij de sectie werd geen doodsoorzaak gevonden.

De controle-muis met $\frac{3}{4}$ c. c. niet afgekoeld bloed geënt, stierf in 4 dagen, met een incubatie-tijd van 1 dag.

VIII. *Trypanosoma Venezuelense*.

a. Temperatuur: 4° — 8° C. (Ijskast).

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	4
1	"	"	3	6
2	verminderd	iets gezwollen	3	5
3	zwak	gezwollen	—	1 ¹⁾
4	geen	"	—	1 ¹⁾
5	"	"	—	6 ¹⁾

¹⁾ Gestorven aan coli-infectie.

Bij een, sterk met *Tryp. Venezuelense* besmette, cavia werd bloed uit de arteria carotis ontnomen en in Na-citraat-oplossing opgevangen. Het verdunde bloed, in buisjes ingesmolten, werd in de ijskast bewaard en een muis ter contrôle met versch materiaal geënt, welke muis, zooals uit de tabel blijkt, in 4 dagen na de enting aan de Trypanosomen-infectie stierf.

De Trypanosomen, in de ijskast bewaard, verminderden snel in beweeglijkheid en hun uiterlijk veranderde eveneens snel.

De muizen, geënt met bloed, dat 1 en 2 dagen bij 4° — 8° C. bewaard was, stierven in 6 en 5 dagen tengevolge van Trypanosomen-infectie, terwijl bij beide muizen de incubatie-tijd even lang (3 dagen) was.

De oorzaak van den dood der 3 andere muizen, geënt met bloed, dat gedurende 3, 4 en 5 dagen bewaard was, bleek bij de sectie een etterige peritonitis te zijn, veroorzaakt door coli-bacteriën.

De oorzaak van deze (secundaire) infectie bleef onopgehelderd.

Bij een tweede proef werd nagegaan of glucose, serum of *HCl* op het leven van het *Tryp. Venezuelense*, in de ijskast bewaard, invloed had.

De bloedgeefster was een cavia, waarbij hartpunctie gedaan

werd. Het bloed werd in Na-citraatoplossing opgevangen. Bij een gedeelte hiervan werd 1 % glucose gedaan; bij een ander deel werd konijnsersum gevoegd en bij nog een ander gedeelte werd een spoor *HCl*-oplossing van 0.3 % gevoegd, hetgeen volgens von Prowazek een gunstigen invloed op het leven der Trypanosomen in vitro zou uitoefenen (Zie bladz. 10).

b. Temperatuur: 4° — 8° C. (Ijskast).

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
1	"	"	2	8
2	verminderd	"	3	8
3 ¹⁾	"	iets gezwollen	—	4 ⁵⁾
3 ²⁾	"	" "	4	7
3 ³⁾	"	" "	4	8
3 ⁴⁾	"	gezwollen	—	6 ⁵⁾
4 ¹⁾	geen	"	—	blijft in leven
4 ²⁾	zwak	"	—	" " "
4 ³⁾	geen	"	—	" " "
4 ⁴⁾	"	"	—	" " "

¹⁾ = bloed + natriumcitraat-oplossing.

²⁾ = " + " " " + glucose.

³⁾ = " + " " " + serum.

⁴⁾ = " + " " " + *HCl*.

⁵⁾ Dood niet door Trypanosomen.

Uit deze tabel blijkt, dat noch het konijnen-serum, noch het *HCl* eenigen invloed op de beweeglijkheid of de pathogeniteit der Trypanosomen uitoefende. Daarentegen schijnt dat glucose invloed had, wat betreft den langeren duur der beweeglijkheid van de parasieten, zonder dat echter de duur van de virulentie verlengd werd.

Bij deze proef bleven de Trypanosomen 4 dagen beweeglijk en 3 dagen infectieus. De incubatie-tijd werd door het afkoelen langer en de muizen stierven in een wisselend aantal

dagen, nadat de Trypanosomen in het bloed verschenen waren.

De contrôle-muis was 1 dag na de enting besmet en stierf 2 dagen daarna aan de infectie.

Bij de sectie van de muis, geënt met bloed + *HCl*, werd geen oorzaak van den dood gevonden. De lever en de milt waren niet gezwollen en entingen in bouillon en op agar leverden niets op.

c. **Temperatuur: — 20° C. (Vriestank).**

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	6	15
2	zwak	..	11	15
2 1/4	twijfelachtig	iets gezwollen	11	16
2 1/2	geen	" "	11	17
2 3/4	"	gezwollen	11	15
3	"	"	17	21
3 1/4	"	"	—	blijft in leven
3 1/2	"	"	—	" " "

In bovenstaande tabel wordt in 't kort het resultaat opgegeven, van een proef, waarbij het Tryp. Venezuelense gedurende verschillend langen tijd bij een temperatuur van — 20° C. afgekoeld werd.

Direct valt daarin op de vrij lange tijd, die na de enting verliep, voordat de geënte muizen Trypanosomen in het perifere (staart-)bloed vertoonden. Bij de 2 vorige proeven en ook bij die, welke hierna besproken worden, bleken de contrôle-muizen, die intraperitoneaal geënt waren met versch geïnfecteerd bloed, reeds 1 dag na de enting met Trypanosomen geïnfecteerd te zijn.

De contrôle-muis van deze proef bleek pas 6 dagen, nadat het bloed subcutaan boven den staartwortel geïnjecteerd was, met Trypanosomen besmet te zijn en stierf na 15 dagen. Ook de incubatie-tijd bij de overige muizen, die eveneens subcutaan geïnoculeerd werden, was vrij lang en ze stierven

in 4—6 dagen, nadat de Trypanosomen bij hen waren aangetoond.

De langere incubatie en de latere dood zijn dus zeer waarschijnlijk aan de *subcutane* enting toe te schrijven.

Verder blijkt uit de tabel, dat ik in het bloed, dat 2½ uur bij — 20° C. gehouden was, geen beweeglijke Trypanosomen meer heb kunnen vinden. Het aspect der Trypanosomen in het bloed, dat langer dan 2 uur afgekoeld was, ging veranderen. Heel merkwaardig bij deze proef was, dat de incubatie-tijd bij de met afgekoeld bloed geënte muizen, uitgezonderd één, evenlang was, nl. 11 dagen, wat 5 dagen langer was dan bij de contrôle-muis.

De muizen, die geënt waren met bloed, dat gedurende 3¼ en 3½ uur bij — 20° C. gehouden was, bleven in leven. 32 dagen daarna werden deze muizen opnieuw geënt met versch materiaal; ze stierven 4 dagen na de enting aan een sterke Trypanosomen-infectie en evensnel als de muis, die ter contrôle geënt was. Ze hadden dus door de enting met het afgekoelde materiaal geen spoor van immuniteit verkregen.

Naar het schijnt was dus het Tryp. Venezuelense, nadat het langer dan 3 uur bij — 20° C. gehouden was, dood.

Dat het Tryp. Venezuelense het slechts enkele uren bij — 20° C. uithoudt, blijkt ook uit de volgende proef.

d. Temperatuur: — 20° C. (Vriestank).

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	4
3	geen	gezwollen	—	blijft in leven
3½	"	"	—	" " "
4	"	"	—	" " "
4½	"	"	—	" " "
5	"	"	—	" " "
5½	"	"	—	" " "
6	"	"	—	" " "
6½	"	"	—	" "

Alle muizen, met het afgekoelde bloed geïnoculeerd, bleven in leven en vertoonden geen Trypanosomen in het perifere (staart-)bloed, terwijl de muis, met het versche, geïnfecteerde bloed geënt, 4 dagen na de enting aan de infectie stierf met een incubatie-tijd van 1 dag. In het afgekoelde bloed, dat ongeveer 15 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, werden geen beweeglijke Trypanosomen gevonden en het uiterlijk voorkomen der parasieten was gezwollen. De muizen met het afgekoelde bloed geënt, hadden geen immuniteit verworven, want ze stierven na een herhaalde enting, die 33 dagen later plaats vond, in 4 à 5 dagen en evensnel als de contrôle-muis.

e. Temperatuur: — 189° C. (Vloeibare lucht).

Tijd van afkoeling in minuten.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	4
8	geen	"	5	11
9	"	"	—	blijft in leven
11	"	"	9	15
13	"	"	7	11
15	"	"	3	17
18	"	"	7	11
20	"	"	9	13
22	"	"	—	blijft in leven
25	"	"	9	14
30	"	"	9	14

Zooals uit de tabel blijkt, werden in het afgekoelde bloed geen beweeglijke Trypanosomen gevonden. Wel werden in de gemaakte praeparaten enkele parasieten gezien, die normaal van uiterlijk waren.

Toch was het bloed nog infectieus, want de muizen (uitgezonderd twee stuks) bleken een wisselend aantal dagen na de enting besmet en stierven aan de infectie. De incubatie-tijd werd door het afkoelen aanmerkelijk verlengd, want, terwijl de contrôle-muis na 1 dag reeds Trypanosomen in

het staartbloed vertoonde, bleken de muizen met het afgekoelde bloed geënt, pas geïnfecteerd na 5—13 dagen.

De muizen die na de enting in leven bleven, waren geïnoculeerd met $\frac{1}{10}$ c. c., daar enkele van de buisjes, welker inhoud voor de inoculatie bestemd was, tijdens het afkoelen in de vloeibare lucht, stukgesprongen waren. De hoeveelheid bloed, die bij deze muizen is ingebracht, was dus of te klein geweest, of bij de bewerking is de een of andere fout begaan, die niet opgespoord kon worden. De andere muizen werden geënt met $\frac{1}{2}$ c. c.

De twee in leven gebleven muizen waren niet immuun geworden, want na de herhaalde enting, die 31 dagen later plaats vond, stierven ze, de een in 4, de ander in 5 dagen, met een achterblijven op de controle van 1, respectievelijk 2 dagen aan de typische infectie.

Toen gebleken was, dat het Tryp. Brucei in de vloeibare lucht dagen lang beweeglijk en infectieus bleef, was dit aanleiding ook het Tryp. Venezuelense langer af te koelen, met het volgende resultaat:

f. Temperatuur: ongeveer -- 190° C. (Vloeibare lucht).

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	2
1	iets verminderd	„	4	10
2	„	„	6	11
4	„	„	6	10
8	„	„	6	11
12	„	„	6	14
21	„	„	9	11
28	„	„	—	5 ¹⁾
28	„	„	9	9
60	geen	„	8	16
60	„	„	10	16

¹⁾ Dood niet aan Trypanosomen-infectie.

Sterk geïnfecteerd cavia-bloed, door hartpunctie verkregen, werd in dunne glazen buisjes gedaan, die daarna werden dicht gesmolten, en op het Fysisch Laboratorium in groote bollen met vloeibare lucht werden gehangen.

Na 1, 2, 4 dagen enz., zooals in de tabel is aangegeven, werden telkens een aantal buisjes uit de lucht gehaald, naar het Laboratorium voor Vergelijkende Pathologie gebracht en daar verder onderzocht.

De muizen werden telkens geënt met $\frac{6}{10}$ c.c. afgekoeld bloed, behalve de 4 laatste, die elk $\frac{3}{10}$ c.c. kregen. Nadat het bloed tusschen 15 en 30 minuten bij kamer-temperatuur gestaan had, werd onderzocht of er nog beweeglijke Trypanosomen te vinden waren.

Het bleek, dat zelfs na 28 dagen afkoeling nog beweeglijke exemplaren gevonden konden worden. Heel duidelijk blijkt dus hieruit, evenals dat het geval was met het Tryp. equiperdum, dat de Trypanosomen na afkoeling in vloeibare lucht gedurende eenigen tijd, als het ware verstijfd zijn door de doorgestane koude, in een toestand van verdooving zich bevinden, waaruit ze gewekt worden, wanneer ze eenigen tijd, maar langer dan 5 minuten, bij kamertemperatuur gehouden zijn. Want bij de vorige proef konden in het afgekoelde bloed, dat ongeveer 5 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, geen beweeglijke Trypanosomen meer worden gevonden.

Dat het bloed in de vloeibare lucht virulent gebleven was, blijkt uit den dood der muizen, die na 4—9 dagen besmet bleken te zijn.

Een muis, geënt met bloed, dat 28 dagen in de lucht gestaan had, stierf 5 dagen na de enting, zonder dat er Trypanosomen gevonden waren. Bij de sectie bleek dat lever noch milt vergroot waren, vocht in borst en buik aanwezig was, terwijl geen Trypanosomen in het harteblod waren te vinden.

In bloed, dat 60 dagen in vloeibare lucht geweest was, konden geen beweeglijke Trypanosomen meer gevonden worden, terwijl nog veel exemplaren een normaal aspect vertoonden; toch moeten er nog parasieten levensvatbaar

gebleven zijn, want 2 muizen, die elk met 0,4 c.c. van dit afgekoelde bloed geïnjecteerd werden, bleken na 8, respectievelijk 10 dagen besmet te zijn.

Langer dan 60 dagen zijn deze Trypanosomen in vloeibare lucht niet afgekoeld.

IX. Trypanosoma Brucei.

a. Temperatuur: 4°–8° C. (Ijskast).

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	5
1	"	"	4	11
2	verminderd	gezwollen	6	7
3	zwak	"	—	blijft in leven
4	geen	"	—	" " "

Het Tryp. Brucei, in de ijskast bewaard, bleef 3 dagen beweeglijk en 2 dagen infectieus.

De beweeglijkheid der Trypanosomen verminderde langzamerhand en het uiterlijk voorkomen was na 2 dagen bewaren, sterk veranderd.

De incubatie-tijd werd door het afkoelen van het bloed langer, want, terwijl de contrôle-muis reeds 1 dag na de enting Trypanosomen in het staartbloed had, verschenen de parasieten bij de muizen, geënt met 1 en 2 dagen afgekoeld bloed, na respectievelijk 4 en 6 dagen in het perifere bloed. Verder valt op, dat de muis, die geënt was met bloed, dat 2 dagen bewaard was, reeds 7 dagen na de enting stierf. Blijkbaar heeft deze muis dus weinig weerstand aan de infectie geboden.

De muizen, die met 3 en 4 dagen afgekoeld bloed geënt waren, bleven in leven, hoewel bij de eerste nog zwak beweeglijke, maar gezwollen Trypanosomen geënt zijn.

Bij een tweede proef werd nagegaan of glucose of serum

aan het bloed toegevoegd, invloed had op het leven van het Tryp. Brucei, wanneer dit in de ijskast bewaard werd. Hiervoor werd het cavia-bloed, na de opvang in de natriumcitraat-oplossing, voor een deel gemengd met 1 0/0 glucose, bij een ander deel werd wat cavia-serum gevoegd.

Van een gunstigen invloed van glucose, met betrekking tot den langeren duur der beweeglijkheid, werd niets gemerkt; wel behield het bloed langer haar pathogeniteit, daar de muis geënt met bloed + glucose, dat 3 dagen in de ijskast bewaard was, 4 dagen na de enting geïnfecteerd bleek te zijn en 2 dagen later aan de infectie stierf.

Van een gunstigen invloed van het cavia-serum werd niets gemerkt, noch wat de beweeglijkheid, noch wat de virulentie der Trypanosomen betreft.

b. Temperatuur: 4° — 8° C. (Ijskast).

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
1	"	"	2	5
2	verminderd	"	3	4
3 ¹⁾	zwak	iets gezwollen	—	blijft in leven
3 ²⁾	"	"	4	6
3 ³⁾	"	"	—	blijft in leven
4 ¹⁾	geen	gezwollen	—	" " "
4 ²⁾	"	"	—	" " "
4 ³⁾	"	"	—	" " "

¹⁾ bloed + natriumcitraatoplossing.

²⁾ " + " " " + glucose.

³⁾ " + " " " + serum.

Ook bij deze proef verminderden de Trypanosomen langzamerhand in beweeglijkheid en het uiterlijk der parasieten veranderde reeds na den tweeden bewaardag.

De incubatie-tijd werd door het afkoelen langer, naarmate de bewaartijd langer werd.

c. **Temperatuur: — 5° C. tot — 16° C. (Frigo).**

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	4
1	verminderd	gezwollen	2	6
2	zwak	"	—	blijft in leven
3	geen	"	—	" " "

Het Tryp. Brucei bleef in de Frigo, bij een temperatuur van — 5° C. tot — 16° C., 2 dagen beweeglijk en 1 dag infectieus. De muis geënt met bloed, dat 1 dag bij deze schommelende temperatuur bewaard was, stierf in 6 dagen aan de infectie, na een incubatie-tijd van 2 dagen, Het achterblijven op de contrôlemuis was 1 dag.

De beweeglijkheid der parasieten was duidelijk verminderd en hun uiterlijk gezwollen,

Nadat het bloed 2 dagen in de Frigo geweest was, werden daarin enkele uiterst zwak beweeglijke Trypanosomen gevonden, die niet meer infectieus bleken te zijn.

In bloed, dat 3 dagen bewaard was, werden geen beweeglijke Trypanosomen meer gevonden en een enting bij een muis gaf geen resultaat.

De in leven gebleven muizen van de bovenbeschreven 3 proeven werden niet opnieuw geënt, omdat ik aan een eventueel immuniseerende werking van afgekoelde Trypanosomen toentertijd nog geen aandacht geschonken had.

Temperatuur: — 20° C.

Bleven het Tryp. equiperdum en het Tryp. Venezuelense, bij — 20° C. gehouden, 3 uur infectieus, zoo behield het Tryp. Brucei bij deze temperatuur gedurende 3 uur en 45 minuten haar pathogeniteit.

Nadat het bloed 3 uur afgekoeld was, werden geen beweeg-

d. Temperatuur: — 20° C. (Vriestank).

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
1½	"	"	3	4
1	goed	"	3	6
1½	zwak	"	3	6
2	"	"	5	8
2¼	"	iets gezwollen	—	4 ¹⁾
2½	"	" "	8	11
2¾	"	" "	8	10
3	geen	gezwollen	5	9
3¼	"	"	9	14
3½	"	"	5	9
3¾	"	"	9	13

1) Dood niet door Trypanosomen.

lijke Trypanosomen meer gevonden en hun uiterlijk begon te veranderen, nadat ze 2¼ uur waren afgekoeld.

De tijd, die na de enting van het bloed, verliep, voordat de Trypanosomen in het staartbloed van de muizen verschenen, wisselde vrij sterk, maar langer, naarmate het bloed langer werd afgekoeld.

Nog sterker wisselde het aantal dagen dat verliep, voordat de muizen stierven. De oorzaak hiervan ligt zeer waarschijnlijk wel in den meer of minder grooten individueelen weerstand, die de muizen aan de infectie boden.

De doodsoorzaak van de muis, die geënt werd met bloed, dat 2¼ uur afgekoeld was, is niet bekend. Maar zeer zeker is de muis niet aan de Trypanosomen-infectie gestorven, want die werden tijdens het leven en ook bij de sectie niet gevonden. De borstholte bevatte een weinig helder vocht, de longen waren zeer bloedrijk, de lever en de milt waren niet gezwollen. Entingen uit de organen in bouillon of op agar zijn niet verricht.

Omdat de Trypanosomen, na $3\frac{3}{4}$ uur bij -20°C . nog niet gestorven waren, werd de tijd verlengd. Het resultaat blijkt uit de volgende tabel.

e. Temperatuur: -20°C . (Vriestank).

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
3	geen	gezwollen	5	9
$3\frac{1}{2}$	"	"	7	10
4	"	"	—	blijft in leven
5	"	"	—	" " "
6	"	"	—	" " "
7	"	"	—	" " "
8	"	"	—	" " "
9	"	"	—	" " "
10	"	"	—	" " "

Het geïnfecteerde cavia-bloed was nog virulent, nadat het $3\frac{1}{2}$ uur bij -20°C . was afgekoeld, hoewel geen beweeglijke Trypanosomen meer in een praeparaat gevonden werden.

Bloed, dat 4 uur en langer in de vriestank gehangen had, had alle virulentie verloren en de geënte muizen werden niet meer besmet.

Ook waren de muizen niet immuun geworden, want na de tweede enting stierven ze allen in 3—5 dagen aan een hevige infectie, terwijl de contrôle-muis na 1 dag besmet bleek en 4 dagen na de enting stierf.

Toen het Tryp. Brucei na urenlange afkoeling in de vloeibare lucht infectieus bleef (zie bladz. 77) ging ik aan de mededeeling van Laveran en Mesnil, waarin deze erkende Trypanosomen-kenners zeggen „Trypanosomen sterven des te sneller, naarmate de temperatuur lager is”, twijfelen.

Ik had mij voorgenomen een zoo zuiver mogelijk vergelijkende proef te nemen door het Tryp. Brucei tegelijk bij

— 20° C. en bij — 190° C. af te koelen, muizen met het afgekoelde bloed, direct na het ontdooien, te enten en eerst naar beweeglijke Trypanosomen te gaan zoeken, wanneer het afgekoelde bloed ten minste 15 minuten bij kamertemperatuur had gestaan.

Omdat voor deze proef veel bloed noodig zou zijn en ik wilde werken met even oude Trypanosomen, entte ik 2 ongeveer even zware marmotten intraperitoneaal, ieder met 1 c.c. verdund, geïnfecteerd bloed van eenzelfde cavia. Bij deze 2 geënte caviae werd 10 dagen later hartpunctie gedaan, nadat ik mij overtuigd had, dat beide dieren sterk geïnfecteerd waren. Het bloed van de dieren werd van elk afzonderlijk in een steriele Petri-schaal met 5 c.c. natriumcitraat-oplossing opgevangen en daarna werden de 2 hoeveelheden verdund bloed met elkaar vermengd. Met dit mengsel werden glazen buisjes gevuld, die dicht gesmolten werden.

Een aantal buisjes werd in de vriestank bij — 20° C. en een ander deel in vloeibare lucht gehangen (zie bladz. 79). De temperatuur van de vriestank schommelde iets en wel tusschen de uitersten van — 19,3° C en — 20,5° C.

Uit de volgende tabel is te zien, dat de contrôle-muis 's morgens om 10 uur geënt, na 6 uur reeds Trypanosomen in het staartbloed vertoonde en 3 dagen na de enting stierf.

Een muis, met $\frac{6}{10}$ c.c. bloed geënt, dat 3 uur in de tank gehangen had, bleek 5 dagen na de enting besmet en stierf in 8 dagen. In het bloed, dat na de afkoeling 15 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, waren geen beweeglijke Trypanosomen meer te vinden. Het lichaam was gezwollen en gegranuleerd. In het bloed, dat 4 uur, 5 uur enz. afgekoeld was, waren evenmin beweeglijke Trypanosomen te vinden en normale vormen werden niet gezien. Ook heb ik bij geen der, met dit afgekoelde bloed geënte, muizen, die allen $\frac{6}{10}$ c.c. ontvingen, ooit Trypanosomen kunnen vinden. Wel stierven 6 van deze muizen, verschillend langen tijd na de enting, maar bij de sectie werd niets afwijkends gevonden, met name geen lever- of milt-vergrooting, en geen Trypanosomen in het hartebloed.

Een oorzaak van hun dood weet ik niet aan te geven, wel stierven in dezen tijd verschillende kleine laboratorium-dieren, die met deze proeven niets hadden uit te staan. Tot nu toe had ik als regel aangenomen, dat muizen, met afgekoeld geïnfecteerd bloed geënt, die in 30 dagen geen Trypanosomen in hun bloed vertoonden, ook daarna niet meer geïnfecteerd zouden worden, mits de contrôle-muis, met versch bloed geënt, na enkele dagen wel de parasieten vertoonde.

Hierom heb ik de muizen, die na 30 dagen nog in leven waren, niet opnieuw geënt, om te kunnen controleeren, dat inderdaad later dan 30 dagen na de enting geen ziek zijn meer optrad.

f. Temperatuur: -20° C. tot -19° C. (Vriestank).

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	$\frac{1}{4}$	3
3	geen	gezwollen	5	8
4	"	"	—	blijft in leven
5	"	"	—	" " "
6	"	"	—	37 ¹⁾
8	"	"	—	blijft in leven
9	"	"	—	15 ¹⁾
10	"	"	—	46 ¹⁾
11	"	"	—	26 ¹⁾
12	"	"	—	blijft in leven
24	"	"	—	25 ¹⁾
48	"	"	—	30 ¹⁾

¹⁾ Niet gestorven aan Trypanosomiasen.

Het hoofdresultaat van deze proef is dus dat Nagana-bloed, dat 3 uur bij -20° C. gehouden is, weinig of niets van haar virulentie heeft verloren, terwijl Nagana-bloed, dat 4 uur bij dezelfde temperatuur bewaard is, niet meer virulent is.

De volgende proef, waarvan het resultaat in onderstaande tabel wordt weergegeven, is genomen in het Fysisch Laboratorium, reeds lang voordat eenig resultaat met het afkoelen van Trypanosomen in vloeibare lucht bereikt werd. Hoewel deze (naast de beschrevene met Tryp. Equiperdum) de eenige

g. Temperatuur: ongeveer — 145° C. (Cryostaat).

Tijd van afkoeling in minuten.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	5
14	niet nagegaan	niet nagegaan	2	6
19	" "	" "	6	10
23	" "	" "	3	7
27	" "	" "	6	10
32	" "	" "	6	7

is, die nog met de Cryostaat, op blz. 26 beschreven, werd genomen, lijkt het mij toch gewenscht deze te vermelden.

Het geïnfecteerde bloed, in buisjes gebracht, die daarna toegesmolten werden, werd bij kamertemperatuur ($\pm 18^{\circ}\text{C.}$) in het toestel geplaatst. Eerst langzaam, daarna iets sneller werd het toestel afgekoeld, totdat na 36 minuten een temperatuur van -145°C. bereikt werd, bij welke temperatuur het bloed 14 minuten bleef. Nu werden er enkele buisjes uitgehaald, het bloed ontdooid en hiervan bij een muis $\frac{1}{2}$ c. c. geënt. Door het openen van het toestel om de buisjes door te laten, steeg de temperatuur tot -137°C. Na 5 minuten werden er weer een paar buisjes uitgehaald, nadat de temperatuur weer op -145°C. gebracht was, de temperatuur steeg weer, nu tot -139°C. , die direct weer op -145°C. gebracht werd enz.

Nadat de Trypanosomen 32 minuten bij ongeveer -145°C. geweest waren, sprong er iets van het toestel kapot, waardoor de proeven niet verder konden worden voortgezet. Praeparaten met de bedoeling de beweeglijkheid en de vormeigenschappen van de afgekoelde Trypanosomen na te gaan, heb ik niet kunnen maken.

Uit de tabel blijkt, dat de Trypanosomen hoegenaamd niets van hun virulentie verloren hadden. De incubatie-tijd werd, zooals bij alle genomen proeven, door het afkoelen langer, terwijl de muizen een wisselend aantal dagen na de enting stierven.

h. Temperatuur: — 1910, 5 C. (Vloeibare lucht).

Tijd van afkoeling in minuten.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	6
5	goed	"	4	9
7	"	"	4	9
10	"	"	4	9
13	"	"	8	18
15	"	"	4	8
18	"	"	8	12
20	"	"	—	blijft in leven

Omdat het Tryp. equiperdum aanvankelijk, na afkoeling gedurende 30 minuten in vloeibare lucht, 2 muizen niet meer infecteerde, meende ik dat de tijd, waarin het Tryp. Brucei, in vloeibare lucht bewaard, zou afsterven, eveneens ongeveer 30 minuten zou bedragen. Want bij 4° — 8° C. bewaard, bleef het Tryp. Brucei hoogstens 3 dagen en het Tryp. equiperdum hoogstens 2 dagen infectieus; terwijl de afstervings-tijd bij — 20° C. voor het eerstgenoemde Trypanosoom 3³/₄ uur en voor het andere 3 uur bedroeg.

Ik begon met het Tryp. Brucei gedurende 5 minuten in vloeibare lucht af te koelen, daarna 7 minuten enz., zooals in de tabel is aangegeven.

Bij het microscopisch onderzoek, 5 minuten nadat het bloed ontdooid was, vond ik in een praeparaat enkele vrij goed beweeglijke Trypanosomen, die hun slanke gedaante bewaard hadden. Het meerendeel der parasieten was onbeweeglijk, maar normaal van aspect. De incubatie-tijd bleek door het afkoelen verlengd te worden, maar de Trypanosomen

hadden weinig of niets van hun virulentie verloren. Alle met het afgekoelde bloed geënte muizen zijn aan de infectie gestorven, behalve de muis, geïnoculeerd met bloed, dat 20 minuten in de vloeibare lucht geweest was. Deze muis bleef in leven en in het staartbloed werden geen Trypanosomen gevonden.

Om na te gaan of de muis, door de injectie met de afgekoelde Trypanosomen, eenige immuniteit gekregen had, werd na 30 dagen $1\frac{1}{2}$ c. c. versch. geïnfecteerd bloed ingebracht, maar nu stierf het dier in 4 dagen aan de infectie en even snel als de contrôle-muis.

In tegenstelling dus met het Tryp. Evansi, immuniseerde het Tryp. Brucei na 20 minuten afkoeling in vloeibare lucht, de geënte muizen niet. Waarschijnlijk was echter bij de afkoeling gedurende 20 minuten een of andere fout begaan; daarom werd nog eens een tweede proef genomen, waarvan het resultaat hieronder volgt.

i. Temperatuur: -191° C. (Vloeibare lucht).

Tijd van afkoeling in minuten.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1	3
15	zwak	"	3	5
16	"	"	3	5
17	"	"	3	5
18	"	"	4	10
19	"	"	3	6
20	"	"	3	6
21	"	"	7	11

Alle, met het afgekoelde bloed, geënte muizen werden na een, in vergelijk met den tijd bij de contrôle-muis, iets verlengden incubatie-tijd geïnfecteerd en stierven in 5—11 dagen na de inoculatie aan de typische infectie.

Na 21 minuten in vloeibare lucht geweest te zijn, waren dus deze Nagana-Trypanosomen niet gestorven en daarom

werd in een derde proef de tijd van afkoeling verlengd tot 1 uur toe.

Ook had ik bij een muis bloed willen inspuiten, dat 40 minuten in de vloeibare lucht afgekoeld was geweest, maar de hiervoor bestemde buisjes met bloed sprongen stuk, doordat die te snel in de lucht werden ondergedompeld. Den volgende morgen, ongeveer 17 uur later, vond ik de stukken van de buisjes terug op den bodem van het vacuum-glas, waarin nog een weinig vloeistof aanwezig was; de temperatuur hiervan was -184° C. Ik verzamelde nu die stukken, goot, na het ontdooien, den inhoud daarvan op een horloge-glas, zoog het weinigje bloed (0,2 c. c.) in een spuit op en injecteerde het intraperitoneaal bij een muis, verwachtende geen positief resultaat te zullen krijgen. Het resultaat van deze proef is mede in de onderstaande tabel opgenomen.

j. Temperatuur: $-189^{\circ},5$ C. (Vloeibare lucht).

Tijd van afkoeling.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0 minuten	normaal	normaal	1	3
21 "	zwak	"	—	3 ¹⁾
25 "	"	"	3	6
27 "	"	"	3	6
31 "	geen	"	3	6
33 "	"	"	4	7
37 "	"	"	4	8
45 "	"	"	4	6 ¹⁾
1 uur	"	"	—	3 ¹⁾
17 "	"	"	4	9

¹⁾ Dood niet door Trypanosomen.

Om begrijpelijke redenen was ik dus verbaasd deze muis na 4 dagen met Trypanosomen besmet te vinden, terwijl de dood volgde in 9 dagen na de enting.

Behalve dit resultaat leverde deze proef nog meer op.

Dat de gebruikte Trypanosomen sterk virulent waren, bleek uit de spoedige infectie en dood van de contrôle-muis. Dat de incubatie-tijd door het afkoelen langer werd, blijkt uit de andere, met het afgekoelde bloed, geënte muizen. Maar alle muizen (behalve 2) stierven in 3—9 dagen na de enting aan de Trypanosomen-infectie. Bij twee muizen zijn tijdens het leven en na den dood geen Trypanosomen gevonden. De muis, geïnoculeerd met bloed, dat 21 minuten was afgekoeld, stierf 3 dagen na de enting aan een etterige peritonitis, veroorzaakt door coli-bacteriën. Bij de sectie van de muis, die 3 dagen na de enting met bloed, dat 1 uur was afgekoeld, stierf, werd geen doodsoorzaak gevonden.

Heel eigenaardig gedraagt zich echter de muis, geënt met bloed, dat 45 minuten was afgekoeld. Bij deze muis werden 4 dagen na de enting Trypanosomen in het perifere bloed gevonden. Na 9 dagen was de muis sterk geïnfecteerd, maar enkele dagen later was, na lang zoeken, slechts een enkel Trypanosoom in een praeparaat te vinden. Het verschijnen in groot aantal en bijna weer totaal verdwijnen der Trypanosomen trad nu periodiek in het perifere bloed op, totdat 61 dagen na de inoculatie de muis stierf. Bij de sectie werd een sterk gezwollen lever en milt gevonden en het harte-bloed bevatte massa's Trypanosomen.

Eenzelfde verschijnsel had ik bij muizen nooit gezien, omdat een muis, die met pathogene Trypanosomen eenmaal goed geïnfecteerd was, steeds binnen enkele dagen aan de infectie ten gronde ging. Wel had ik hetzelfde bij Guineesche biggetjes nu en dan waargenomen.

Beweeglijke Trypanosomen had ik in bloed, dat 31 minuten en langer in de vloeibare lucht gestaan had, niet gezien.

De volgende proef is reeds op bladz. 72 aangeduid.

Uit de tabel blijkt, dat het Tryp. Brucei, nadat het gedurende 12 uur in vloeibare lucht was geweest, nog beweeglijk en infectieus was.

Bij de vorige proef had ik in het bloed, dat 31 minuten

afgekoeld geweest was, en daarna ongeveer 5 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, geen beweeglijke Trypanosomen meer kunnen vinden.

Ik liet nu het bloed na de afkoeling gedurende 15—30 minuten bij kamertemperatuur staan, voordat ik in een praeparaat naar beweeglijke Trypanosomen ging zoeken, om de eventueel nog levende parasieten voldoende gelegenheid te geven van de doorgestane koude weer eenigzins te bekomen. Met een paar uitzonderingen vond ik steeds beweeglijke exemplaren en het bloed was, zooals reeds gezegd is, na 12 uur afkoeling nog infectieus.

k. Temperatuur: -190°C . (Vloeibare lucht).

Tijd van afkoeling in uren.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	$\frac{1}{4}$	3
2	iets verminderd	"	2	9
3	geen	"	6	11
4	"	"	8	13
5	iets verminderd	"	—	3 ¹⁾
6	" "	"	6	10
7	geen	"	6	9
8	iets verminderd	"	8	13
9	" "	"	6	9
11	" "	"	5	8
12	" "	"	5	9

¹⁾ Dood niet door Trypanosomen.

De muis die geënt was met bloed, dat 5 uur in de vloeibare lucht geweest was, stierf aan een purulente peritonitis.

Bij een laatste proef met het Tryp. Brucei genomen, vond ik in bloed, dat 11 dagen in vloeibare lucht gestaan had, nog beweeglijke parasieten in een praeparaat gemaakt van bloed, dat 20 minuten bij kamertemperatuur gestaan had. Evenzoo kon ik in bloed, dat 1, 2, 4 en 6 dagen bij ongeveer

— 190° C. geweest was, steeds beweeglijke parasieten vinden. De Trypanosomen bleken niets of bijna niets van hun virulentie te hebben verloren, want alle geënte muizen stierven in 3—13 dagen na de enting aan de infectie.

Langer dan 11 dagen heb ik het Tryp. Brucei in de vloeibare lucht niet afgekoeld, maar toen gebleken was, dat deze Trypanosomen-soort het dagen bij deze zeer lage temperatuur uit hield, heb ik, zooals reeds medegedeeld is op bladz. 51 en bladz. 65 ook het Tryp. equiperdum en het Tryp. Venezuelense dagen en weken in vloeibare lucht afgekoeld, daarna steeds beweeglijke parasieten in een praeparaat kunnen vinden, terwijl de, met het afgekoelde bloed, geënte muizen aan de infectie stierven.

1. Temperatuur: ongeveer — 190° C. (Vloeibare lucht.)

Tijd van afkoeling in dagen.	Beweeglijkheid der Trypanosomen.	Uiterlijk der Trypanosomen.	Incubatie-tijd in dagen.	Dood van de muis in dagen.
0	normaal	normaal	1/4	3
1	iets verminderd	„	4	9
1	„ „	„	7	13
2	„ „	„	5	8
2	„ „	„	5	11
4	„ „	„	4	9
6	„ „	„	6	11
11	„ „	„	5	10

HOOFDSTUK III.

ALGEMEEN OVERZICHT DER VERKREGEN RESULTATEN EN GEVOLGTREKKINGEN.

Trypanosoma Lewisi.

Hetgeen Laveran en Mesnil, Jürgens en anderen berichten over het bewaren van het *Tryp. Lewisi* in de ijskast (bladz. 8), werd door de genomen proefnemingen bevestigd.

Eveneens bleek de *sterk levensverlengende invloed van glucose*, want terwijl het *Tryp. Lewisi* in de ijskast (temp. 4° — 8° C.) bewaard, zonder dat glucose aan de natrium-citraatoplossing was toegevoegd, na 35 dagen (bladz. 38) een rat niet meer infecteerde en geen beweeglijke Trypanosomen in het bloed meer te vinden waren, besmette het rattenbloed, waaraan behalve de natrium-citraatoplossing 1 % glucose was toegevoegd, een rat nog na 43 dagen bewaren (bladz. 37).

Na een afkoelingstijd van 50 dagen werden nog beweeglijke exemplaren gevonden, die een rat niet meer infecteerden (bladz. 38).

Bij -20° C. gehouden bleek, dat het *Tryp. Lewisi* nog na 1 uur en 20 minuten zwak beweeglijk was (bladz. 39), maar een rat, met het afgekoelde bloed geënt, werd niet meer geïnfecteerd.

Jürgens kon een rat niet meer besmetten met bloed dat 2 uur bij -17° C. was geweest (bladz. 13), terwijl daarentegen Laveran en Mesnil nog een positief resultaat kregen met bloed dat 2 uur bij $-15,5^{\circ}$ C. tot $-18,5^{\circ}$ C. was geweest (bladz. 13).

Dit verschil met mijn resultaten kan veroorzaakt zijn door het feit, dat Laveran en Mesnil werkten met eene temperatuur, die gemiddeld 3° C. hooger was dan die, welke ik gebruikte.

Na 1 uur bij -30° C. geweest te zijn, bleek het bloed, hoewel daarin nog slanke, goed beweeglijke, Trypanosomen gevonden werden, niet meer besmettelijk te zijn (bladz. 40).

In vloeibare lucht afgekoeld, zagen Laveran en Mesnil bloed dat eerst 15 minuten, daarna nog 1 uur afgekoeld was, beweeglijke Trypanosomen en een enting bij een rat gaf een positief resultaat (bladz. 14).

Zelf heb ik het Tryp. Lewisi gedurende 1 uur, 2 uur, 18 uur, 4 en 8 dagen in vloeibare lucht afgekoeld.

Na 1 uur afkoeling waren zwak beweeglijke Trypanosomen te vinden en een rat, met dat afgekoelde bloed geënt, werd besmet.

Na 2 uur en langer bij die temperatuur te zijn geweest, werden geen beweeglijke exemplaren meer gevonden en het bloed was niet meer infectieus (bladz. 41).

Afgezien van deze resultaten is uit mijn onderzoek nog af te leiden, dat *de rangschikking van het Tryp. Lewisi onder de niet-pathogene Trypanosomen-soorten niet geheel juist is*, daar enkele proefdieren, met deze Trypanosomen besmet, tengevolge van die infectie gestorven moeten zijn (bladz. 41).

Ook Rabinowitsch en Kempner zagen enkele van hun proefdieren aan de infectie met het Tryp. Lewisi sterven.

Het Trypanosoma Lewisi stierf dus des te sneller naarmate de temperatuur, bij welke het gehouden werd, lager was.

Trypanosoma Evansi.

Bleef het Tryp. Lewisi gedurende weken in de ijskast beweeglijk en infectieus, zoo kunnen de echte pathogene Trypanosomen, zooals die der Surra zijn, volgens Laveran

en Mesnil in de ijskast ten hoogste 3 dagen beweeglijk en infectieus gehouden worden (bladz. 12).

Uit de op bladz. 43 beschreven proef blijkt, dat het Tryp. Evansi, bij 4° — 8° C. bewaard, na 5 dagen nog zwak beweeglijk en niet langer dan 4 dagen infectieus was.

Maar de resultaten waren niet steeds dezelfde; nu eens waren ze 3 dagen beweeglijk en 3 dagen infectieus, dan weer 5 dagen beweeglijk en 4 dagen infectieus.

De oorzaak hiervoor heb ik gezocht in *het aantal* parasieten, dat in het bloed, vóór de afkoeling aanwezig was.

Met den tijd van afkoeling neemt, naast de *beweeglijkheid* het *aantal* beweeglijke exemplaren af. Want waren in een vochtig dekglas-praeparaat, gemaakt van het in natrium-citraat opgevangen bloed, in 1 gezichtsveld van het microscoop, bijv. gemakkelijk 20 verschillende, slanke, goed beweeglijke parasieten te tellen, dan moest men in het bloed, dat 3 dagen in de ijskast gestaan had, naar beweeglijke Trypanosomen *zoeken* en hun aspect was dan meer of minder veranderd.

Men kan zich dus best voorstellen dat, wanneer in 1 c.c. van het versche bloed bijvoorbeeld 10.000 Trypanosomen waren, er in 1 c. c. van het, gedurende enkele dagen, afgekoelde bloed eerder enkele beweeglijke exemplaren zullen overblijven dan wanneer in 1 c. c. versch bloed slechts 1000 parasieten waren.

Dat *het aantal* en *niet de virulentie* der Trypanosomen beslist, blijkt bijvoorbeeld uit de tabel op bladz. 44, waar de virulentie niets of bijna niets door het afkoelen was afgenomen.

Hoe het Tryp. Evansi zich gedraagt bij -20° C., daarover heb ik in de literatuur niets bepaalds kunnen vinden; het zou zich tegenover lage temperaturen verhouden evenals het Tryp. Brucei (bladz. 17).

Ook mijn eigen proeven geven daaromtrent geen uitsluisel. Wel vond ik in bloed, dat $2\frac{1}{2}$ uur bij -20° C. geweest was, nog zwak beweeglijke Trypanosomen, maar het bloed was niet meer infectieus, waarbij echter opgemerkt dient te worden dat deze Surra-stam toen haar virulentie geheel of bijna geheel voor *muizen* verloren had (bladz. 45).

Laveran en Mesnil, die voorzoover mij bekend is, de eenigen zijn geweest, die Trypanosomen in vloeibare lucht hebben afgekoeld, zeggen van het Tryp. Evansi dat het, na 15 minuten bij -191° C. te zijn geweest, nog beweeglijk en infectieus was. Gedurende 1 uur bij -191° C. gehouden waren enkele parasieten goed beweeglijk, maar niet meer infectieus; evenmin was bloed, dat 24 uur bij -191° C. geweest was, nog infectieus (bladz. 17).

Zelf heb ik het Tryp. Evansi gedurende 9—17 minuten bij -191° C. gehouden; de beweeglijkheid der Trypanosomen was daarna verminderd, maar ze waren normaal van aspect. Muizen met deze minder beweeglijke Surra-trypanosomen geënt, waren na 29 dagen *niet besmet* en bleken, toen zij op dat tijdstip met versch, infectieus materiaal werden geënt, *immuun* te zijn geworden (bladz. 48).

Natuurlijk zijn ook in de literatuur immunisatie-proeven tegen de Trypanosomen beschreven, omdat men waargenomen had, dat sommige dieren, die van een infectie met pathogene Trypanosomen zijn genezen, in sterke mate immuun zijn tegen deze parasieten.

Men probeerde nu ook dieren tegen pathogene Trypanosomen te immuniseeren, door ze in te spuiten met verzwakt of gedood materiaal of met serum van een genezen dier.

Ook trachtte men met geneesmiddelen de trypanosomiasen te bestrijden.

Een afdoend middel heeft men nog niet gevonden; wel schijnen inspuitingen met serum van een genezen dier eenige beschutting te geven tegen een infectie met dezelfde Trypanosomen, als waarvan het dier, dat het serum leverde, is genezen.

De eenige zekere conclusies, uit de proeven te trekken, zijn dus dat:

het Tryp. Evansi een wisselend, echter klein aantal dagen in de ijskast beweeglijk en infectieus bleef;

muizen geïmmuniseerd konden tegen eene Surra-infectie, door ze in te spuiten met Surra-bloed, dat 9—17 minuten in vloeibare lucht was afgekoeld.

Trypanosoma equiperdum.

Yakimoff kon het *Tryp. equiperdum*, in de buurt van 0° C. bewaard, 3 dagen in leven houden (bladz. 12).

Zelf heb ik het niet langer dan 5 dagen beweeglijk en 2 dagen infectieus kunnen houden bij een temperatuur van 4° — 8° C. (bladz. 51).

Het bleef dus *evenlang beweeglijk als het Tryp. Evansi*, maar dit laatste bleef 2 dagen langer infectieus.

Bij — 20° C. gehouden, waren na 2 uur en 10 minuten nog beweeglijke Trypanosomen te vinden; na 2 uur en 20 minuten heb ik geen beweeglijke exemplaren meer gezien, terwijl het bloed, na maximaal 3 uur afkoeling, nog infectieus was, daarentegen na 3 $\frac{1}{4}$ uur niet meer (bladz. 53 en 54).

Bij deze temperatuur was dus het *Tryp. equiperdum* eerder *onbeweeglijk geworden dan het Tryp. Evansi*.

Bij ongeveer — 40° C. gehouden, was het na 1 $\frac{1}{4}$ uur twijfelachtig, of de Trypanosomen nog beweeglijk waren of niet; na 1 $\frac{1}{2}$ uur waren ze zeker onbeweeglijk, maar niet dood, terwijl na 2 $\frac{1}{4}$ uur de parasieten eveneens nog infectieus waren. Langer dan 2 $\frac{1}{4}$ uur heb ik bij deze temperatuur niet afgekoeld (bladz. 55).

Bij — 145° C. gehouden, vond ik na 35 minuten nog beweeglijke Trypanosomen; nadat het bloed 43 minuten bij deze temperatuur was geweest, kon ik geen beweeglijke exemplaren meer vinden, maar ze bleken nog niet gestorven te zijn; ook na 45 minuten afkoeling bleken de parasieten onbeweeglijk, maar niet gestorven te zijn.

Langer dan 45 minuten is dit Trypanosoom bij deze temperatuur niet afgekoeld (bladz. 57).

Aanvankelijk konden 2 muizen, die met bloed geënt waren, dat 30 minuten in vloeibare lucht geweest was, niet meer geïnfecteerd worden; in bloed, dat langer dan 9 minuten was

afgekoeld, kon ik zelfs geen beweeglijke Trypanosomen meer vinden (bladz. 58).

Uit latere proeven bleek evenwel, dat het Tryp. equiperdum, nadat het 31 dagen in de vloeibare lucht geweest was, nog beweeglijk en in elk geval na 21 dagen ook nog infectieus was (bladz. 59).

Na hoeveel dagen dit Trypanosoom, bij de temperatuur van vloeibare lucht gehouden, zal blijken te sterven, is door mij niet uitgemaakt, daar ik het niet langer dan 31 dagen afgekoeld heb.

Resumeerende blijkt uit deze proeven, dat het *Trypanosoma equiperdum* bij -20° C. bewaard, *veel sneller stierf* dan wanneer het *in de ijskast* (temp.: 4° — 8° C.) bewaard werd en hierin *weer veel sneller* dan wanneer het *in vloeibare lucht* (temp.: ongeveer -190° C.) gehouden werd.

Trypanosoma Venezuelense.

Over afkoelingsproeven met het Tryp. Venezuelense heb ik in de literatuur niets kunnen vinden.

Bij mijn eigen proeven heb ik dit Trypanosoom, in de ijskast bewaard, 4 dagen beweeglijk, maar niet langer dan 3 dagen infectieus kunnen houden. (bladz. 61).

Weer dus een gering verschil met de beide vorige pathogene soorten.

Bij -20° C. gehouden bleef het, evenals het Tryp. equiperdum, 3 uur infectieus en was het na $2\frac{1}{4}$ uur afkoeling twijfelachtig of de Trypanosomen nog beweeglijk waren. (bladz. 62—63).

In vloeibare lucht afgekoeld vond ik na 30 dagen nog beweeglijke Trypanosomen.

In bloed, dat 60 dagen bij deze zeer lage temperatuur geweest was, kon ik geen beweeglijke exemplaren meer vinden, maar de parasieten bleken niet gestorven te zijn.

Langer dan laatstgenoemden tijd van 60 dagen heb ik deze Trypanosomen niet afgekoeld en na hoeveel tijd deze parasieten, bij ongeveer -190° C. gehouden, zullen sterven, weet ik dus niet.

Uit de proeven zijn dus volgende conclusies te trekken:
het *Trypanosoma Venezuelense* blijft bij een temperatuur van -20° C. gehouden slechts korten tijd in leven;

beter verdraagt het de temperatuur van de ijskast (4° — 8° C);

het best verdraagt het de temperatuur van vloeibare lucht (ongeveer -190° C.).

Trypanosoma Brucei.

De verschillende onderzoekers, die met dit Trypanosoom experimenteerden, kregen bij het afkoelen geen constante resultaten; het bleef slechts bij uitzondering 6 dagen in leven (bladz. 12).

Bij 4° — 8° C. bewaard, heb ik het niet langer dan 3 dagen infectieus gezien; *het gelijkt dus in dit opzicht op het Tryp. Venezuelense* (bladz. 68).

Bij -20° C. gehouden bleef dit Trypanosoom $2\frac{3}{4}$ uur beweeglijk, wat ongeveer $\frac{3}{4}$ uur langer was dan bij beide vorige soorten, terwijl het niet langer dan $3\frac{3}{4}$ uur bij deze temperatuur infectieus bleef, wat 45 minuten langer is dan bij beide vorige soorten (bladz. 70—71).

Wel geven Laveran en Mesnil enkele resultaten op over het afkoelen beneden 0° C., van het Tryp. Brucei, maar die zijn alleen aangegeven om te laten zien, dat dit Trypanosoom in leven gebleven was, nadat het bijvoorbeeld 30 minuten bij -15° C. tot -18° C. was afgekoeld.

Omdat zij echter geen nauwkeurige gegevens verschaffen omtrent den afstervingsijd van deze parasieten bij bepaalde, lage temperaturen (bladz. 16) kan ik de uitslagen van mijn proeven niet met de hunne vergelijken.

Ook koelden deze onderzoekers het Tryp. Brucei *niet langer*

dan 25 minuten in vloeibare lucht af, waarna het nog virulent was (bladz. 16).

Langer dan 11 dagen heb ik zelf het *Tryp. Brucei* niet afgekoeld. Steeds vond ik beweeglijke exemplaren na de afkoeling en het bloed bleef virulent.

Ook voor dit Trypanosoom weet ik dus niet aan te geven, hoe lang het in vloeibare lucht moet worden afgekoeld om te sterven.

De resultaten van de proeven zijn:

het *Tryp. Brucei* stierf zeer snel, wanneer het bij -20°C . gehouden werd;

langer bleef het in leven, wanneer het in de ijskast (temp.: $4^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$. bewaard werd;

het langst verdroeg het de temperatuur van vloeibare lucht (ongeveer -190°C .).

De verschillen in weerstand, die de verschillende pathogene Trypanosomen-soorten boden aan de inwerkingen van de gebruikte, lage temperaturen, waren dus veel te gering om als een kenmerk der soorten te kunnen dienen.

Wanneer echter Laveran en Mesnil zeggen, dat Trypanosomen in het algemeen sneller sterven naarmate de temperatuur lager is en pathogene Trypanosomen in het bijzonder, niet langer dan 5—6 dagen in leven gehouden kunnen worden, bij welke temperatuur ook bewaard, dan blijkt toch wel zeer duidelijk uit de beschreven proeven, dat die stellingen in hun algemeenheid niet juist zijn. Want Trypanosomen sterven niet sneller naarmate de temperatuur lager is en pathogene Trypanosomen kunnen wel degelijk langer dan 5—6 dagen bewaard worden.

De betreffende mededeelingen in het handboek van Laveran en Mesnil zullen dus op grond van dit onderzoek geheel moeten worden herzien.

De beste methode, om op het laboratorium het *Tryp. Lewisi*

het langst in leven te houden, schijnt te zijn, afgezien van de culturen, het steriel opvangen van het geïnfecteerde bloed in een steriele oplossing van natrium-citraat, waaraan een weinig glucose is toegevoegd, en het daarna bewaren in de ijskast.

De beste methode, om op het laboratorium pathogene Trypanosomen het langst in leven te houden, schijnt te zijn, afgezien van de culturen, het steriel opvangen van het geïnfecteerde bloed in een steriele oplossing van natrium-citraat, waaraan een weinig glucose is toegevoegd, en het daarna bewaren in vloeibare lucht.

Op de vraag, waarom Trypanosomen in het algemeen sneller stierven bij -20°C. dan bij $4^{\circ} - 8^{\circ}\text{C.}$, en waarom pathogene Trypanosomen in vloeibare lucht, zelfs na 60 dagen, nog niet waren gestorven, kan ik geen antwoord geven.

Wel zijn in de literatuur enkele dergelijke resultaten verkregen met het afkoelen van bacteriën, te vinden.

Zoo heeft Paul¹⁾ gezien, dat gedroogde staphylococcen bij kamertemperatuur eerder sterven dan in de ijskast en daarin weer veel vroeger dan in vloeibare lucht.

Paul geeft hiervan de volgende verklaring:

Het leven van de aerobe en zeer waarschijnlijk ook van de anaerobe bacteriën is, evengoed als het leven der planten, aan de zuurstof gebonden. Ze nemen de zuurstof op en verbranden die tot kooldioxyde, dat weer afgescheiden wordt. Omdat nu de gedroogde staphylococcen, die tot de aerobe bacteriën behooren, nog langen tijd levend blijven, zoo moet de ademhaling, al is het in beperkten omvang, toch voortduren en hiervoor moet in de bacteriën een zekere hoeveelheid oxydeerbare stoffen, die hij reservestoffen noemt, aanwezig

¹⁾ Paul, Der chemische Reaktionsverlauf beim Absterben trockener Bakterien bei niederen Temperaturen. Biochemische Zeitschrift, Achtzehnter Band, 1909, S. 1.

zijn, die door de celmembraan heendringende zuurstof, langzamerhand verbrand worden, welke verbranding een chemische reactie is. De reactie-snelheid is van de temperatuur afhankelijk, is des te grooter naarmate de temperatuur hooger is en vandaar dat nu de gedroogde staphylococcen bij ongeveer -190°C . bewaard, langer in leven blijven dan in de ijskast, en hierin weer langer dan wanneer ze bij kamertemperatuur worden bewaard. Paul berekent nu, dat die droge bacteriën bij ongeveer -190°C . gehouden, $(1,7)^{20}$ maal langzamer afsterven dan in de ijskast.

Willen wij deze verbrandings-theorie toepassen op Trypanosomen, dan blijkt het dat zij niet opgaat. Want dan zouden Trypanosomen bij -20°C . bewaard, langer in leven moeten blijven dan bij de temperatuur van de ijskast en dat doen ze niet. Bovendien zou het Tryp. Lewisi in vloeibare lucht langer in leven moeten blijven dan bij -20°C . en hierbij weer langer dan bij $4^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$. en dat gaat in 't geheel niet op.

Dat de zuurstof niet die rol speelt bij het langen tijd in leven houden van wezens in vloeibare lucht bewaard, zooals Paul aanneemt, blijkt uit de onderzoekingen van Rahm, die mosdiertjes in drogen toestand in vloeibare lucht en vloeibare waterstof bewaarde ¹⁾).

Hij verrichtte die onderzoekingen gedeeltelijk in het Fysisch Laboratorium van Prof. Kamerlingh Onnes en zag dat, zoowel in vloeibare lucht (ongeveer -190°C .) als in vloeibare waterstof (ongeveer -253°C .) gestopt, sommige diertjes na 16 dagen nog levend waren en in de vloeibare waterstof zullen ze toch moeilijk zuurstof kunnen vinden.

Bovendien zag Rahm nog het volgende: koelde hij niet uitgedroogde mosdiertjes snel af, dan stierven ze bij die buitengewone koude, maar koelde hij ze zeer langzaam af, dan verdroegen ze, zonder veel nadeel, dezelfde koude.

¹⁾ Rahm, Einwirkung sehr niederer Temperaturen auf die Moosfauna. Reprinted from; Proceedings Vol. XXIII, Nos. 2 and 3. Koninklijke Akademie van Wetenschappen, Amsterdam.

Rahm denkt nu aan een mechanische vernietiging van de plasma-structuur door de snelle afkoeling.

Ook deze verklaring gaat bij Trypanosomen niet op, daar ze zoowel bij -20°C . als bij -190°C . zeer snel, in elk geval binnen 1 minuut, aan de inwerking van die temperatuur werden blootgesteld.

Dat de zuurstof ook bij bacteriën wel de rol niet zal vervullen, die Paul er aan toeschrijft, was niet reeds gebleken uit de onderzoeken van Beijerinck en Jacobsen, die behalve vloeibare lucht ook vloeibare waterstof op bacteriën deden inwerken, in het laatste geval in gesloten ballons, zoodat lucht aanwezig was ¹⁾.

Ook Bequerel schijnt bacteriën aan zeer lage temperaturen te hebben onderworpen, wat blijkt uit een korte mededeeling in de verslagen van het eerste internationale koude-congres in 1908 te Parijs gehouden. In die verslagen is daaromtrent echter niets naders te vinden. ²⁾

Het Trypanosomen-houdend bloed werd verdund met een oplossing van 0,5 % Na-citraat en 0,5 % Na Cl.

Het is mogelijk, dat verschil in ionen-concentraties, electrolytische dissociaties, colloïed-chemische werkingen en andere, bij de gebruikte temperaturen verschillend waren, doch dan blijft het nog altijd vreemd, dat het Tryp. Lewisi in zeer korten tijd bij de temperatuur van vloeibare lucht stierf, terwijl bijv. het Tryp. Venezuelense gedurende maanden bij dezelfde temperatuur in leven bleef.

Het is verder mogelijk, dat bij de zeer lage temperatuur

¹⁾ Beijerinck et Jacobsen. Influence des températures absolues de 82 et 20 degrés centigrades sur la vitalité des microbes. Premier congrès international du froid, Paris, 1908.

²⁾ Bequerel. Sur les travaux qu'il a poursuivis au laboratoire Cryogène de Leyde concernant la vitalité des bactéries soumises à de très basses températures. Premier congrès international du froid, Paris, 1908.

van vloeibare lucht de Trypanosomen plotseling door deze lage temperatuur verstijven, zonder langzaam doorvriezen, terwijl daarvoor bij -20°C . langeren tijd noodig is en bij het in bochten wringen geen gelijkmatig doorvriezen plaats heeft, doch het eene deel na het andere verstijft, en het totaal gedesorganiseerd wordt, en onherroepelijk voor vernieuwd leven ongeschikt.

Bij deze laatste temperatuur gehouden, zouden de Trypanosomen zich, als het ware, langzaam doodwerken, wat bij -190°C ., door die plotselinge fixatie, niet zou kunnen gebeuren.

Ook dit kan niet juist zijn, want dan zouden alle onderzochte soorten zich ongeveer gelijkwaardig moeten gedragen en dat is niet het geval.

Het weinig pathogene Tryp. Lewisi stierf des te sneller, naarmate de temperatuur lager werd.

De echte pathogene soorten, als bijvoorbeeld het Tryp. Venezuelense, stierven in enkele uren bij een temperatuur van -20°C . en bleven in vloeibare lucht afgekoeld, in leven, hoe lang ik ze ook afkoelde.

Het zou dus mogelijk zijn, dat *in de pathogeniteit de oorzaak gelegen was* voor het verschillend gedrag der Trypanosomen, wanneer ze bij -20°C . en bij -190°C . gehouden werden.

Of deze veronderstelling juist is, zouden verdere proeven kunnen leeren, door eerst een sterk virulente Trypanosomensoort bij -20°C . en bij -191°C . af te koelen, daarna dezelfde soort minder en minder virulent te maken, totdat ze tenslotte al haar virulentie verloren had en tijdens het virulentie-verlies de proeven bij -20°C . en bij -190°C . telkens te herhalen.

STELLINGEN:

I.

Onbeweeglijke Trypanosomen zijn niet altijd dood, beweeglijke Trypanosomen zijn niet altijd infectieus.

II.

Tusschen -20° C. en -193° C. moet een temperatuur gelegen zijn, die de pathogene Trypanosomen, na een zekeren tijd van afkoeling bij die temperatuur, juist nog doodt.

III.

In vele gevallen van „essentieele hypertonie” daalt de bloedsdruk na het verrichten van de lumbale punctie.

IV.

Bij goed gediagnostiseerde gevallen van dementia paralytica is een „malaria-behandeling” te beproeven.

V.

Het bepalen van de snelheid van de leverfunctie door, na parenterale toediening van kleurstoffen, gal met den duodenaalcatheter op te vangen, geeft aanleiding tot onjuiste gevolgtrekkingen.

VI.

Het meten van de conjugata vera door middel van Röntgen-foto's geeft geen betrouwbare uitkomsten.

VII.

Bij onderbinding van de arteria carotis communis of van de arteria carotis interna onderbinde men tevens de vena jugularis.

VIII.

Voor het onderzoek der kleurenblinden zou het gewenscht zijn om gekleurde tafels samen te stellen naar het model van die van Stilling, die echter, in tegenstelling met deze, door de kleurenblinden gemakkelijker herkend zouden worden dan door de normalen.

IX.

Ingewandswormen, welke als zoodanig voor den gastheer reeds een gevaar opleveren, kunnen bovendien door de slijmvlies-verwondingen welke zij veroorzaken, een porte d'entrée verschaffen aan verschillende pathogene microörganismen.

X.

Parabiose verhoogt niet de gevoeligheid van de, voor Jensen-tumoren, immune rat, noch geeft het immuniteit aan de, voor die tumoren, gevoelige rat.

XI.

Voor de rationeele bevordering van de volksgezondheid in Nederlandsch Indië is de instelling van een departement van volksgezondheid gewenscht.

XII.

De werking der emetine bij lijders aan entamoebiasis vormt geen argument voor de juistheid van de opvatting van Kuenen en Swellengrebel, dat minuta-vormen en cysten van dysenterie-entamoeben in den darm aanwezig kunnen zijn, zonder histolytische vormen in het weefsel.

